



CONCEPTION ET CARACTERISATION DE BIOCAPTEURS BASES SUR L'ASSOCIATION DE RECEPTEURS ET CANAUX IONIQUES

Lydia Caro

► To cite this version:

Lydia Caro. CONCEPTION ET CARACTERISATION DE BIOCAPTEURS BASES SUR L'ASSOCIATION DE RECEPTEURS ET CANAUX IONIQUES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00544513

HAL Id: tel-00544513

<https://theses.hal.science/tel-00544513>

Submitted on 8 Dec 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Grenoble
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Thèse pour obtenir le grade de
DOCTEUR ès SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
Spécialité: Biologie Structurale et Nanobiologie

présentée et soutenue publiquement
par
Lydia CARO
le 30 septembre 2010

CONCEPTION ET CARACTÉRISATION DE BIOCAPTEURS
BASÉS SUR L'ASSOCIATION DE RÉCEPTEURS ET
CANAUX IONIQUES

Directeur de thèse

Dr Michel VIVAUDOU

Jury

Président : Pr Michel SÈVE

Rapporteur : Dr Denis SERVENT

Rapporteur : Dr Pierre CHARNET

Examineur : Dr Renaud WAGNER

Examineur : Dr Michel PARTISETI

Examineur : Dr Michel VIVAUDOU

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes sincères remerciements au Docteur Denis Servent, au Docteur Pierre Charnet, au Docteur Michel Partiseti, au Docteur Renaud Wagner ainsi qu'au Professeur Michel Sève pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie également le Professeur Eva Pebay-Peyroula, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse à l'Institut de Biologie Structurale, au sein du Laboratoire des Protéines Membranaires, et ce, dans les meilleures conditions.

Un grand merci à Michel Vivaudou pour son encadrement, ses bons conseils et son enthousiasme. Ces trois ans de thèse ont été, pour moi, très enrichissants tant d'un point de vue scientifique que personnel.

Merci aux membres de l'équipe Transporteurs, Récepteurs et Canaux Ioniques, pour leur disponibilité et leur présence. Merci à Christophe pour les discussions autour du poste de double-microélectrodes, pour ses idées, ses suggestions, son enthousiasme et son aide précieuse, à Jean pour sa rigueur et son esprit critique, à Laurie-Anne, pour le tri des ovocytes et sa bonne humeur. Merci également à Argel, nouvellement arrivé au sein de l'équipe, pour sa disponibilité. De plus, je souhaiterais remercier Julien Dupuis qui m'a en partie formée lors de ma première année de thèse.

J'ai beaucoup apprécié ces trois années au sein du laboratoire des protéines membranaires, qui regorge de personnalités tant sympathiques qu'intéressantes. Merci à Richard (pour sa gentillesse et son humour), Michel T. (AKA Bob le bricoleur), Romain (pour le squattage de bureau), Julieta, Eric C., Eric G., Anne, Corinne, Céline, les Antoine, Anne-Emmanuelle, Jean-Michel, Franck et les autres. Merci aussi à Davizinho (pour avoir supporté avec le sourire mes "Oi! Tudo Bem?" quotidiens), Jérôme, Carlos, Thierry...

Enfin, je souhaiterais exprimer toute ma gratitude envers mes parents qui m'ont soutenue tout au long de ces huit années d'études et qui se sont montrés très patients à mon égard.

Table des matières

Table des figures	v
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	xi
Abréviations utilisées pour les acides aminés	xv
Préface	xix
I Introduction	1
Rappel sur la membrane plasmique et ses propriétés électriques	3
0.1 Structure et fonction de la membrane plasmique	3
0.2 Propriétés électriques des membranes et canaux ioniques	4
0.2.1 Concepts de base	4
0.2.2 Modèle électrique de la membrane	6
0.2.3 Répartition ionique de part et d'autre de la membrane	8
0.2.4 Fonctions cellulaires des canaux ioniques	8
1 Les Canaux Potassiques Sensibles à l'ATP	11
1.1 Bref historique	11
1.2 Propriétés des canaux K_{ATP}	12
1.2.1 Composition et stœchiométrie des canaux K_{ATP}	12
1.2.2 Assemblage et adressage membranaire	13
1.3 Les canaux potassiques rectifiants entrants : Kir	13
1.3.1 Caractéristiques principales des canaux Kir	13
1.3.2 Lumière sur les canaux Kir6.1 et Kir6.2	24
1.4 SUR, un transporteur ABC à part	26
1.4.1 La grande famille des transporteurs ABC	26

1.4.2	Le récepteur des sulfonylurées	32
1.5	Un biocapteur naturel : Le canal K_{ATP}	34
1.5.1	Communication entre Kir6.x et SUR	34
1.5.2	Physiologie des canaux K_{ATP} à l'échelle de la cellule et de l'organe ; pathologies associées	35
1.5.3	Pharmacologie des canaux K_{ATP}	43
2	Les Récepteurs Couplés aux Protéines G	47
2.1	Généralités	47
2.1.1	Caractéristiques générales des GPCR	47
2.1.2	Classification	52
2.1.3	Structures connues de GPCR eucaryotes	56
2.2	Voies de signalisation	57
2.2.1	Les protéines G	57
2.2.2	La signalisation indépendante des protéines G	62
2.2.3	Réponses induites à l'échelle cellulaire	68
2.3	Régulation de l'expression et de l'activité des GPCR	69
2.3.1	Adressage membranaire	69
2.3.2	Oligomérisation	69
2.3.3	Désensibilisation	71
2.3.4	Régulation négative	72
2.3.5	Internalisation	72
2.4	Les GPCR, cibles pharmaceutiques de choix	74
2.4.1	Pathologies associées	74
2.4.2	Médicaments	74
2.5	GPCR étudiés	75
2.5.1	Récepteur β_2 adrénergique	75
2.5.2	Récepteur dopaminergique D3	76
2.5.3	Récepteur cannabinoïde 1	76
2.5.4	Rhodopsine	77
2.5.5	Récepteur des CC-chimiokines 2	77
3	Biocapteurs Faisant Intervenir des Canaux Ioniques	79
3.1	Pores modifiés	79
3.2	Protéines de fusion ou mutants	80
3.2.1	Canaux photoactivés	80
3.2.2	Le récepteur 5-HT _{3A}	80
3.2.3	Ion Channel-Coupled Receptors	82

II	Matériel et Méthodes	85
4	Biologie Moléculaire	89
4.1	Clones et Vecteurs d'Expression	89
4.2	Construction des protéines de fusion et mutants	90
4.2.1	Sous-clonage par ligation	90
4.2.2	Mutagenèse dirigée	90
4.2.3	Fusions GPCR-Kir6.2	92
4.2.4	Délétion de grands fragments	93
4.3	Amplification du matériel génétique	93
4.3.1	Transformation des bactéries compétentes	93
4.3.2	Purification de l'ADN plasmidique	93
4.4	Séquençage	95
4.5	Transcription <i>in vitro</i>	95
5	Expression Hétérologue	97
5.1	L'ovocyte de xénope comme outil d'expression hétérologue	97
5.2	Extraction et préparation des ovocytes	98
5.3	Microinjection des ARNm	99
6	Caractérisation Fonctionnelle	101
6.1	Patch-clamp	101
6.1.1	Principe	101
6.1.2	configurations utilisées en patch-clamp	102
6.1.3	Description du poste de patch-clamp	104
6.1.4	Conditions expérimentales	105
6.1.5	Traitements des données	108
6.2	Double micro-électrodes	111
6.2.1	Principe	111
6.2.2	Conditions expérimentales	111
6.2.3	Traitement des données	112
III	Résultats	115
7	Canal K_{ATP}	117
7.1	Test de composés sur le canal K_{ATP}	117
7.1.1	Position du problème	117
7.1.2	Test de composés sur le canal K_{ATP}	117
7.2	Etude de l'effet de pesticides sur le canal K_{ATP}	122
7.2.1	Position du problème	122

7.2.2	Résultats	123
7.2.3	Discussion	124
8	ICCR	127
8.1	Nouveaux ICCR : de la conception à la caractérisation	127
8.1.1	Position du problème	127
8.1.2	Construction des couples β_2 -Kir6.2	128
8.1.3	Le couple D3-Kir6.2	138
8.1.4	Le couple CB1-Kir6.2	142
8.1.5	Le couple opsine-Kir6.2	146
8.1.6	Le couple CCR2-Kir6.2	156
8.2	M2-Kir6.2, outil d'exploration de l'arrangement du complexe	158
8.2.1	Sensibilité à l'ATP	159
8.2.2	Association SUR/M2-K0-25	162
8.2.3	Discussion	163
	Conclusions et Perspectives	169
	Bibliographie	173

Table des figures

1	Représentation de la membrane plasmique.	4
2	Exemple du potentiel d'action d'une cellule nerveuse.	5
3	Représentation électrique d'un canal ionique.	7
4	Modèle électrique de la membrane.	8
5	Courbes courant-potentiel.	9
1.1	Topologie du canal K_{ATP}	14
1.2	Arbre phylogénétique des 15 membres de la famille Kir	16
1.3	Courbe i-V d'un canal rectifiant entrant.	17
1.4	Circulation des ions au niveau du filtre de sélectivité de KcsA	19
1.5	Positionnement des ions au niveau du filtre de sélectivité de KcsA	19
1.6	Structures de KcsA et MthK	20
1.7	Structures de Kirbac1.1, Kir3.1 et Kir2.2	23
1.8	Régulation du "gating" des canaux Kir par PIP_2	23
1.9	Récapitulatif des différents acteurs de la régulation des canaux Kir.	24
1.10	Classification et topologie des transporteurs ABC	29
1.11	Structures disponibles de transporteurs ABC	30
1.12	Séquences consensus des NBD	31
1.13	Mécanisme de transport des protéines ABC	32
1.14	Rôle des canaux K_{ATP} dans la sécrétion d'insuline	37
1.15	Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule nerveuse	39
1.16	Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire lisse.	41
1.17	Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire squelettique.	42
1.18	Rôle des canaux K_{ATP} dans le myocarde.	43
1.19	Formules chimiques de quelques ouvreurs potassiques agissant sur le canal K_{ATP}	44
1.20	Formules chimiques développées des inhibiteurs utilisés au laboratoire.	46
2.1	Structure générale des GPCR.	49
2.2	Modèle du complexe ternaire.	50
2.3	Modèle ternaire étendu.	50

2.4	Modèle ternaire cubique.	51
2.5	Courbes doses-réponse représentatives des différents types de ligands.	52
2.6	Classification GRAFS des GPCR.	55
2.7	Structures connues de GPCR [110].	58
2.8	Le cycle fonctionnel des protéines G	60
2.9	Structure des protéines G hétérotrimériques	61
2.10	Voies de signalisation des GPCR	63
2.11	Mode d'action de la β -arrestine	65
2.12	Interaction entre le récepteur glutamate métabotrope et les protéines Homer.	66
2.13	Activation de la voie JAK-STAT indépendante des protéines G par les GPCR	67
2.14	Régulation de l'échangeur de Na^+/H^+ (NHE) par le récepteur β_2 adrénergique	68
2.15	Internalisation des GPCR par la voie des clathrines	73
3.1	Principe de l'utilisation de l'hémolysine modifiée en tant que biocapteur.	81
3.2	Récepteur glutamate ionotrope activé par la lumière.	82
3.3	Principe de fonctionnement des ICCR.	83
3.4	Récapitulatif de l'ensemble des étapes mises en œuvre dans le cadre de cette étude.	87
4.1	Représentation schématique de pGEMHE, vecteur d'expression protéique adapté à l'ovocyte de xénope.	90
4.2	Principe de la mutagenèse dirigée réalisée avec le kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).	91
4.3	Stratégie utilisée pour réaliser les fusions GPCR-Kir6.2 par PCR.	92
4.4	Stratégie mise en œuvre pour supprimer de grands fragments par PCR.	94
4.5	Principe de la transcription <i>in vitro</i> avec le kit mMessage Transcription Machine T7 (Ambion).	96
5.1	<i>Xenopus laevis</i>	97
5.2	Représentation d'un ovocyte de xénope au stade V ou VI.	98
5.3	Différentes étapes de l'expression de canaux ioniques dans l'ovocyte de xénope	100
6.1	Configurations utilisées en patch-clamp.	103
6.2	Poste de patch-clamp.	104
6.3	Schéma représentant les connections entre les différents composants du poste de patch-clamp	106

6.4	Ovocyte avec sa membrane vitelline (à gauche). Ovocyte débarrassé de sa membrane vitelline (à droite)	106
6.5	Dispositif expérimental et solutions mis en œuvre dans le cadre de la mesure de courants potassiques en patch-clamp.	107
6.6	Dispositif de perfusion utilisé pour le patch-clamp.	109
6.7	Enregistrement obtenu par la méthode patch-clamp excisé "inside-out" 109	
6.8	Principe de la méthode de double micro-électrodes.	111
6.9	Poste de double micro-électrode.	112
6.10	Enregistrement obtenu par la méthode de double-microélectrode. . .	114
7.1	Effet du composé K0CF1 sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. .	118
7.2	Effet du composé K0CN1 sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. .	119
7.3	Effet du composé PTC1-6Cl7F sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2.120	
7.4	Effet du composé PTC1-6Cl7Cl sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2.120	
7.5	Effet des composés K0CN1, K0CF1, PTC1-6Cl7Cl, PTC1-6Cl7F sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 en 0 μ M ATP.	121
7.6	Effet du diflubenzuron sur le canal K_{ATP}	123
7.7	Effet de l'amitraz sur le canal K_{ATP}	124
8.1	Alignement de la zone de fusion entre différents GPCR et Kir6.2. . .	128
8.2	Stratégie mise en œuvre pour élaborer les ICCR basés sur le récepteur β_2 adrénergique.	129
8.3	Courants basaux obtenus avec les différentes constructions testées. .	130
8.4	Test de la fonctionnalité de β_2 -K-0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25. . .	132
8.5	Effet provoqué par un antagoniste, l'alprenolol, sur β_2 -K-0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25.	133
8.6	Courbe concentration-réponse du salbutamol.	134
8.7	Courbe concentration-réponse de timolol.	135
8.8	Courbes concentration-réponse d'isoprotérénol réalisées avec les mutants E122W.	135
8.9	Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25 et D3-K0-25.139	
8.10	Courant basal de la construction D3-K0-25 seul ou en présence de TMD0. Potentiel : -50 mV.	139
8.11	Test de fonctionnalité de D3-K0-25.	140
8.12	Principe du contrôle de fonctionnalité de D3 au sein de la fusion. . .	141
8.13	Contrôle de fonctionnalité de D3 au sein de la fusion D3-K0-25. . . .	141
8.14	Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25 et CB1-Kir6.2.142	
8.15	Courants de base de CB1-K0-25 et CB1-K0-25 + TMD0.	143
8.16	Fonctionnalité du couple CB1-K0-25 testée en présence de W102 1 μ M.144	
8.17	Intégrité de la fonction de CB1 dans le couple CB1-K0-25.	145

8.18	Alignement de la zone de fusion des ICCR M2-K0-25, D2-K0-25, ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25.	146
8.19	Activation de l'opsine par le rétinol tout-trans (noté atret).	148
8.20	Effet de l'hydroxylamine 10 mM sur l'activation induite par le rétinol tout-trans 5 μ M.	149
8.21	Traces représentatives obtenues en TEVC de dose-réponse de rétinol tout-trans.	149
8.22	Courbe dose-réponse de rétinol tout-trans sur opsine + Kir3.1*.	150
8.23	Courants de base des constructions ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25 \pm TMD0. Potentiel : -50 mV.	151
8.24	Enregistrements représentatifs obtenus en TEVC sur ops-K0-25 + TMD0, ops-K-16-25 + TMD0 et ops-K-25-25 + TMD0.	152
8.25	Tests de fonctionnalité de l'opsine au sein des fusions ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25.	153
8.26	Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25, CCR2-K0-25.	156
8.27	Courant de base des constructions CCR2-K0-25 et CCR2-K0-25 + TMD0. Potentiel : -50 mV.	157
8.28	Fonctionnalité de CCR2 seul ou en fusion avec Kir6.2.	158
8.29	Deux configurations envisageables des ICCR. (1) Les GPCR n'interagissent pas entre eux. (2) Les GPCR forment des dimères.	159
8.30	Courbes doses-réponse d'ATP sur les couples M2-K0-0, M2-K0-20, M2-K0-25, M2-K0-30 exprimés seuls, avec SUR1, SUR2A ou TMD0.	161
8.31	Effet de l'ouvreur pinacidil (10 μ M) sur M2-K0-25 + SUR2A en présence d'ATP 100 μ M. Potentiel : -50 mV.	162
8.32	Effet de l'ouvreur diazoxide (300 μ M) sur M2-K0-25 + SUR2A en présence de 100 μ M ATP et 100 μ M ADP. Potentiel : -50 mV.	162
8.33	Effet du glibenclamide à 300 nM sur M2-K0-25 + SUR2A en présence de 10 μ M ATP. Potentiel : -50 mV.	163

Liste des tableaux

1	Concentrations extra- et intracellulaires des espèces ioniques libres chez une cellule de mammifère.	9
1.1	Localisation tissulaire des isoformes de SUR et Kir6.2	12
1.2	IC ₅₀ des inhibiteurs pour les canaux SUR1+Kir6.2 et SUR2A+Kir6.2.	46
2.1	Les différents types de ligands interagissant avec les GPCR.	53
2.2	Sous-unités des protéines G α et leurs effecteurs.	62
2.3	Les différentes sous-unités $\beta\gamma$ et leurs effecteurs.	62
2.4	Pathologies associées à des mutations gain de fonction ou perte de fonction, d'après Schöneberg <i>et al.</i> [267].	75
4.1	Cycles de PCR	93
4.2	Concentrations des ARNm utilisés.	96
5.1	Quantité d'ARNm injectée pour chaque construction, par ovocyte.	99
6.1	Tableau résumant les différents composants du poste de patch-clamp.	105
6.2	Fréquences de filtrage des enregistrements suivant l'amplitude du courant.	110
6.3	Les différents composants du poste de double micro-électrodes.	113
7.1	Récapitulatif des composés testés.	122
8.1	Récapitulatif des EC ₅₀ pour les constructions M2-Kir6.2.	161

Liste des abréviations

α HL	α hémolysine
5HT	5-hydroxytryptamine
ABC	ATP Binding Cassette
AChBP	Acetylcholine Binding Protein
ACR	amplificateur à contre réaction
AGS	Activators of G protein Signaling
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AP-2	Adaptator Protein 2
ATP	Adenosine TriPhosphate
atret	rétinal tout-trans
AVRP2	Arginine VasoPressine Receptor 2
C-ter	C-terminal(e)
canaux K_{ATP}	Canaux Potassiques Sensibles à l'ATP
CaR	Calcium Receptor
CB1	récepteur cannabinoïde 1
CCR2	récepteur des CC-chimiokines 2
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CGRP	Calcitonine Gene-Related Peptide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNG	Cyclic Nucleotide Gated Channels
COPI	Coat Protein Complex 1
CTE	Complexe Ternaire Etendu

D3	Récepteur dopaminergique D3
DAG	DiAcyl Glycerol
DDM	<i>n</i> -Dodécyl- β -D-Maltoside
ddNTP	didesoxyribonucléotide triphosphate
DEND	Delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
dNTP	desoxyribonucléotides triphosphate
ECL	ExtraCellular Loop
ERK	Extracellular-Regulated Kinase
EVH	Ena Vasp Homology
FAb	Fragment AntiBody
FDA	Food and Drug Administration
GABA	γ -AminoButyric Acid
GDP	Guanosine DiPhosphate
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GR	glucose responsive
GRAFS	Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin
GRK	GPCR kinase
GS	glucose sensitive
GTP	Guanidine TriPhosphate
HDM	<i>n</i> -Hexadécyl- β -D-Maltoside
ICCR	Ion Channel-Coupled Receptors
ICL	IntraCellular Loop
iGluR	ionotropic Glutamate Receptor
IP ₃	Inositol TriPhosphate
JAK	JAnus Kinase
KCO	Potassium Channel Opener
Kir	Inward Rectifying Potassium Channel
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase

MDR	MultiDrug Resistance
mGluR	metabotropic Glutamate Receptor
N-ter	N-terminal(e)
NBD	Nucleotide Binding Domain
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor
PCR	Polymerase Chain Reaciton
PDE	PhosphoDiEsterase
PHHI	Hypoglycémie HyperInsulinémique Persistante
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PTX	Toxine pertussique
RE	Réticulum Endoplasmique
RGS	Regulators of G protein Signaling
RIP ₃	Récepteur de l'IP ₃
RRy	Récepteur de la Ryanodine
s.e.m.	Standard Error of the Mean
SBP	Substrate Binding Protein
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
Smo	Smoothened
Src	Sarcoma, famille de tyrosine kinases proto-oncogéniques
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUR	SulfonylUrea Receptor
TAP	Antigen Processing Transporter 1
TEVC	Two-Electrode Voltage Clamp
TMD	TransMembrane Domain
utr	UnTranslated Region
VFTM	Venus Fly-Trap Module
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine

Abréviations utilisées pour les acides aminés

Acide aminé	Abréviation	Lettre correspondante
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Préface

Les protéines membranaires sont un constituant capital de la membrane plasmique et représentent environ 50 % du poids de cette dernière. Elles assurent la communication entre l'environnement et le milieu intracellulaire, jouant un rôle déterminant dans la fonction de la cellule. Lorsque l'on effectue la recherche "membrane protein" sur le moteur PubMed, plus de 1,2 million de publications sont recensées, ce qui témoigne du grand intérêt scientifique qui leur est porté. Leur fonction, au sein de la plaque tournante que constitue la membrane plasmique, justifie la nécessité de comprendre les mécanismes qui régissent leurs comportements.

Les canaux ioniques représentent une des familles de protéines membranaires les plus importantes. Ils jouent un rôle central dans divers processus biologiques tels que la création de signaux électriques dans le système nerveux, ou encore la sécrétion de certaines hormones comme l'insuline. Ces canaux ont la particularité de convertir des événements biologiques en signal électrique.

Le canal sensible à l'ATP, ou canal K_{ATP} , fait partie de cette grande famille et est exprimé dans des types cellulaires variés, allant des neurones aux cellules β du pancréas, en passant par les cellules musculaires lisses. Un canal K_{ATP} fonctionnel résulte de l'association unique d'un récepteur, le récepteur des sulfonylurées (SUR), et d'un canal potassique rectifiant entrant Kir6.x. La régulation de ce canal revêt plusieurs aspects. Son activité peut en effet être modulée par des effecteurs endogènes, ou encore par des molécules pharmacologiques. Cette diversité d'effecteurs révèle la complexité de ce système dont certains mécanismes restent encore à dévoiler. Son mode de régulation physiologique repose principalement sur la valeur du rapport entre la concentration intracellulaire d'adénosine triphosphate (ATP) et celle d'adénosine diphosphate (ADP). Ces deux molécules étant étroitement liées à l'état énergétique de la cellule, le canal K_{ATP} constitue un biocapteur naturel du métabolisme cellulaire. De surcroît, la sous-unité SUR est capable de modifier l'activité de Kir6.x, et ce, suite à son interaction avec différents types de ligands comme les sulfonylurées, classe de composés utilisée pour traiter certains diabètes. De par leur implication dans de telles maladies, il est nécessaire de découvrir de nouveaux composés ciblant le canal K_{ATP} et présentant une efficacité supérieure à ceux utilisés actuellement. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr V. Cecchetti de l'Université de Pérouse, nous avons testé différentes molécules sur le canal K_{ATP} .

La Nature étant une source intarissable d'inspiration, nous avons utilisé le modèle du canal K_{ATP} pour élaborer une nouvelle sorte de biocapteurs électriques artificiels. Cette approche biomimétique nous a permis de mettre en place un couplage fonctionnel entre un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) et Kir6.2, pore du canal K_{ATP} . Cette association n'ayant pas lieu de manière spontanée, nous l'avons forcée en liant de manière covalente ces deux protéines. D'aucun pourrait se demander pour quelles raisons nous avons choisi un canal comme rapporteur de l'activité des GPCR.

La première est historique, puisque Kir6.2, sous-unité du canal K_{ATP} , est étudié au sein du laboratoire depuis de nombreuses années. L'ensemble des connaissances dont nous disposons sur ce canal facilite donc les travaux que nous avons entrepris. De plus, le fait que Kir6.2 soit directement régulé par un récepteur, SUR, en fait un candidat idéal comme composant des ICCR. Ensuite, les canaux ioniques engendrent un courant électrique facilement mesurable grâce aux méthodes d'électrophysiologie dont nous faisons usage au laboratoire. Ce dispositif est également très sensible puisqu'il nous est possible de détecter l'activité d'un seul canal et ce, de manière directe, puisque la cible (le GPCR) est physiquement liée à la sonde (Kir6.2). Nous avons choisi les GPCR car ils constituent l'une des familles de protéines membranaires les plus étendues et sont au centre de diverses fonctions physiologiques. Cela en fait, en cas de dysfonctionnement, les protagonistes d'un bon nombre de pathologies, plaçant ainsi les GPCR en tête des cibles pharmacologiques. Cet aspect laisse donc se profiler de nombreuses applications pour ces biocapteurs artificiels, notamment dans le cadre du criblage haut débit, méthode adoptée par les entreprises pharmaceutiques pour détecter des médicaments potentiels. D'un point de vue un peu plus fondamental, notre système pourrait aider à comprendre plus avant la régulation de l'ouverture et de la fermeture (*i.e.* "gating") de Kir6.2.

Avant de présenter les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, une introduction abordera les différents thèmes touchant à notre sujet d'étude et qui sont nécessaires à la compréhension de notre démarche. Nous présenterons donc un rapide rappel sur les propriétés électriques des membranes qui sera suivi par trois chapitres traitant des canaux K_{ATP} , des GPCR et des biocapteurs faisant intervenir des canaux ioniques. Une seconde partie sera dédiée aux méthodes et matériel utilisés pour mener à bien ces travaux.

Première partie

Introduction

Rappels sur la membrane plasmique et ses propriétés électriques

0.1 Structure et fonction de la membrane plasmique

La membrane plasmique joue un rôle de barrière, séparant le contenu de la cellule de l'environnement. Elle assure également la communication ou l'adhésion entre des cellules voisines (desmosomes, jonctions communicantes). Elle limite la circulation des solutés tandis que d'autres molécules, telles que certains gaz (O_2 , N_2) ou composés hydrophobes, diffusent relativement librement. La membrane assure également la compartimentation de la cellule, séparant différentes organites (mitochondrie, lysosome, chloroplaste...).

Les lipides constituent un des composants majeurs de la membrane plasmique. On compte parmi eux des phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine...), des sphingolipides ou encore le cholestérol. Ces lipides présentent une tête polaire, hydrophile, orientée vers l'extérieur de la bicouche et une queue hydrophobe qui est située en son centre. La composition en lipides peut influencer le fonctionnement d'un autre composant de la membrane : les protéines membranaires. Ces dernières sont, suivant leur agencement par rapport à la membrane, classées en trois catégories :

- Les protéines monotopiques, qui ne traversent pas la membrane de part et d'autre,
- les protéines bitopiques, qui elles, traversent la membrane,
- les protéines polytopiques, qui coupent la membrane à plusieurs reprises.

La membrane plasmique constitue un des lieux de la transduction du signal par le biais de récepteurs, qui, lorsqu'ils sont activés par leur ligand (molécule spécifique), induisent des cascades de signalisation intracellulaires aboutissant à une réponse de la cellule à un stimulus environnemental. Certaines protéines membranaires permettent, entre autres, la diffusion des ions (canaux ioniques), ou encore le transport de cer-

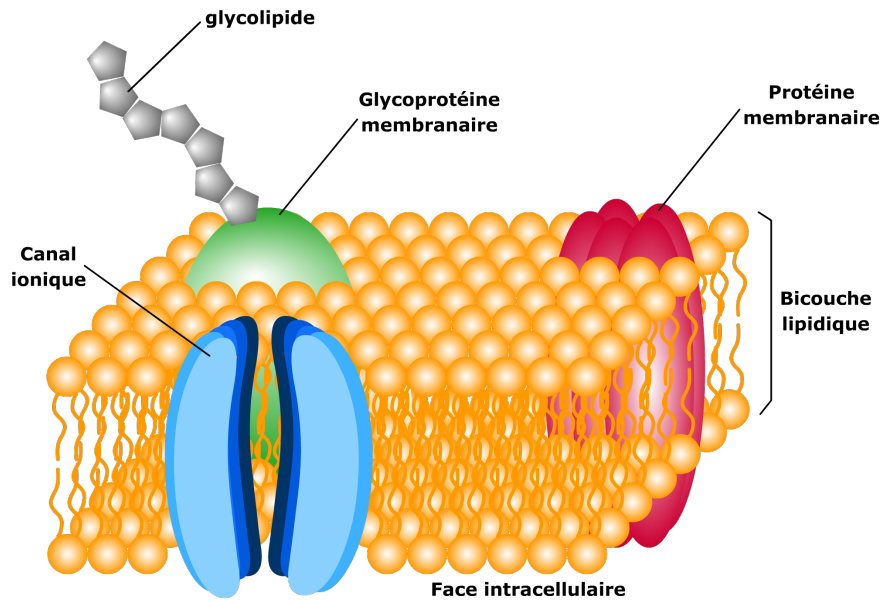


FIGURE 1 – Représentation de la membrane plasmique.

taines molécules comme le glucose (transporteurs). L'importation de ces molécules dans la cellule est nécessaire à sa bonne fonction.

0.2 Propriétés électriques des membranes et canaux ioniques

0.2.1 Concepts de base

De manière générale, l'intensité d'un **courant** (i , mesuré en ampères, A), correspond au déplacement (flux) de charges électriques (q) à travers une surface sur un intervalle de temps défini (dt) ($i = \frac{dq}{dt}$). Cette définition s'applique aux courants ioniques, qui sont engendrés par un flux d'ions. L'ordre de grandeur de ces courants va du picoampère (pA) au microampère (μA). Par convention, l'intensité (i) d'un courant sortant (efflux de cations ou influx d'anions) est positive tandis que celle d'un courant entrant (influx de cations ou efflux d'anions) est négative.

Le déplacement d'un ion d'un point A, possédant un certain potentiel, à un point B de potentiel différent, entraîne le gain ou la perte d'énergie de ce dernier. La différence de potentiel entre les deux points est :

$$\Delta V = V_A - V_B$$

Ce schéma s'applique également à un ion qui transite d'un côté à l'autre de la mem-

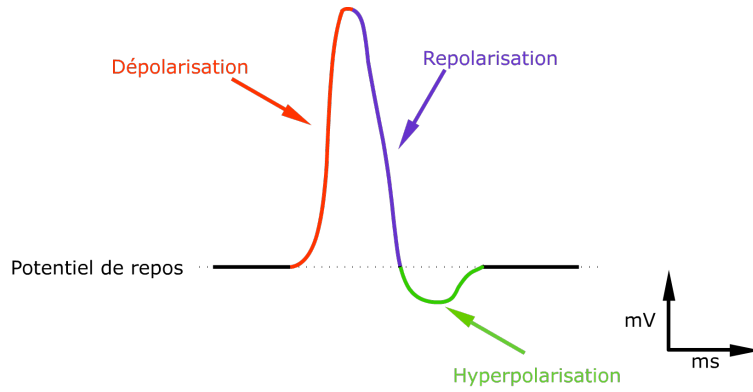


FIGURE 2 – Schématisation d'un potentiel d'action d'une cellule nerveuse. Lorsque qu'une cellule nerveuse est excitée de manière suffisante (seuil de stimulation), celle-ci subit une dépolarisation (en orange). S'ensuit une phase de repolarisation (en bleu) qui est suivie par une étape d'hyperpolarisation (en vert). Le potentiel est alors inférieur au potentiel de repos.

brane. Ainsi, la différence de potentiel entre la face interne et externe de la membrane est appelée **potentiel de membrane** (E_m) :

$$E_m = V_{int} - V_{ext} \quad (1)$$

Un courant entrant induit une dépolarisation (augmentation du potentiel membranaire) et un courant sortant une hyperpolarisation (diminution du potentiel membranaire) de la cellule (fig. 2). Le **potentiel de repos** (E_r) d'une cellule correspond à la situation où la distribution inégale des charges entre l'intérieur et l'extérieur est maintenue. En d'autres termes, la somme des courants qui sont engendrés par le passage des différentes espèces ioniques dans l'ensemble des canaux se doit d'être nulle. Le potentiel de membrane E_m est déterminé par la valeur des potentiels d'équilibre des ions répartis de chaque côté de la membrane. Ainsi, si on suppose qu'une cellule contient un seul type de canaux perméables à une seule espèce ionique, alors, la valeur du potentiel de membrane correspond à celle du potentiel d'équilibre de l'ion considéré, défini par la loi de Nernst (eq. 2) :

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Ion]_{ext}}{[Ion]_{int}} \quad (2)$$

Où,

- **R** est la constante des gaz parfaits, $R=8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$,
- **T** est la température absolue en Kelvins,
- **z** est la valence de l'ion considéré,
- **F**, la constante de Faraday, $F= 96500 \text{ C.mol}^{-1}$,

- $[\text{Ion}]_{ext}$ et $[\text{Ion}]_{int}$ sont les concentrations extra- et intracellulaires de l'ion, respectivement.

Dans le cas où plusieurs espèces ioniques sont impliquées, le potentiel de membrane se rapproche de celui de l'ion le plus perméant. Ainsi, au repos, la membrane étant plus perméable aux ions K^+ que Ca^{2+} , Na^+ et Cl^- , le potentiel de la cellule est assimilable au potentiel d'équilibre du potassium, c'est-à-dire généralement compris entre -50 et -80 mV.

0.2.2 Modèle électrique de la membrane

Deux éléments rentrent dans la détermination des propriétés électriques de la membrane : la capacité et la résistance. La bicouche lipidique, qui est imperméable aux ions, joue un rôle d'isolant et confère à la membrane une capacité électrique. Même si les ions ne peuvent pas traverser la membrane, il leur est possible d'interagir avec elle ce qui résulte en une accumulation de charges (Q , en Coulombs, C) opposées de part et d'autre de la membrane. Ce comportement est similaire à celui d'un condensateur dans un circuit électrique. De par la faible épaisseur de la bicouche lipidique (3 nm), ces charges interagissent électrostatiquement. La capacité (C) se mesure en farads (F) et dépend de l'épaisseur de la membrane et de ses propriétés d'isolation. En outre, la valeur de la capacité influence la façon dont la membrane réagit en réponse à une variation de voltage (ΔV , en Volts). Ainsi, la capacité est définie par l'équation :

$$C = \frac{Q}{\Delta V} \quad (3)$$

Les canaux ioniques, quant à eux, laissent passer les ions de manière spécifique et constituent, lorsqu'ils sont ouverts, une résistance (ou conductance, g). Le modèle électrique de la membrane peut donc être représenté par un condensateur connecté en parallèle à une résistance (fig. 4). Le terme conductance correspond à la perméabilité des canaux aux ions tandis que la résistance reflète l'imperméabilité de ces canaux aux ions. Cette conductance, g , est en fait la somme des conductances de tous les canaux présents à la membrane. Si on considère que N est le nombre de canaux et γ la conductance unitaire (conductance d'un canal), alors, on obtient :

$$g = N \cdot \gamma$$

La conductance (g , en Siemens, S) et la résistance (R) sont liées par l'équation suivante :

$$g = \frac{1}{R} \quad (4)$$

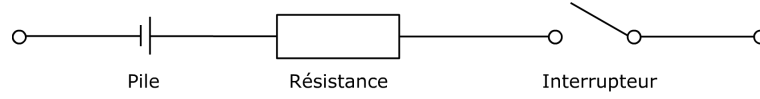


FIGURE 3 – Représentation électrique d'un canal ionique.

Ainsi, à un voltage donné, plus la conductance est élevée, ou la résistance faible, plus les ions traversent facilement la membrane. Un canal peut donc être représenté par une résistance électrique, mais cela est sans compter sur le fait qu'un canal peut exister sous deux configurations : fermée ou ouverte. De cette manière, un canal ionique, sélectif pour un type d'ion, peut être schématisé par une pile (potentiel d'inversion de l'ion considéré), une résistance et un interrupteur (état ouvert/fermé), l'ensemble étant monté en série (fig. 3).

La relation entre la résistance (R , en Ohms, Ω), le courant (i) et le voltage (V) est régie par la loi d'Ohm :

$$V = R \cdot I \quad (5)$$

Si on considère l'équation (4), la loi d'Ohm devient alors :

$$I = g \cdot V \quad (6)$$

Le courant dépend donc du produit de la conductance (facilité des ions à traverser la membrane) et du voltage mesuré de part et d'autre de la membrane.

Si on tient compte de la définition du potentiel de membrane (E_m), défini par l'équation (1), la loi d'Ohm (eq. (6)) peut alors s'écrire :

$$I = g \cdot (V_{int} - V_{ext}) \quad (7)$$

Si on s'intéresse maintenant à un ion en particulier, et que l'on veut déterminer un courant unitaire illustrant la facilité avec laquelle cet ion traverse le canal, il est possible d'écrire, en utilisant la loi d'Ohm :

$$i_{ion} = \gamma_{ion} \cdot (E_m - E_{ion}) \quad (8)$$

Où,

- γ_{ion} est la conductance unitaire du canal (en Siemens),
- E_m est le potentiel de membrane,
- E_{ion} est le potentiel d'équilibre de l'ion, défini par la loi de Nernst,
- $E_m - E_{ion}$ est la force électromotrice appliquée à l'ion.

Cette équation définit la relation entre le courant et le potentiel. Il est alors possible de tracer une courbe appelée courbe courant-potentiel (courbe $i-V$) (fig. 5).

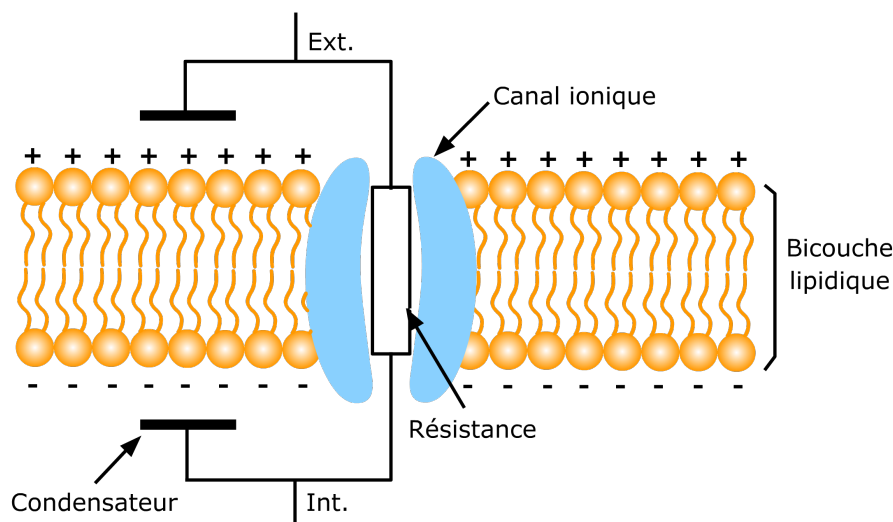


FIGURE 4 – Modèle électrique de la membrane. La bicouche lipidique étant imperméable aux ions, elle peut être représentée par un condensateur tandis que les canaux ioniques constituent des résistances ou conductances.

Si les concentrations sont identiques de part et d'autre de la membrane, le potentiel d'équilibre de l'ion déterminé par la loi de Nernst est nul. De ce fait, en appliquant la loi d'Ohm, le courant s'annule lorsque le potentiel de membrane est égal à 0 mV, il s'agit du potentiel d'inversion de l'ion considéré. Celui-ci illustre la sélectivité du courant. En outre, la pente mesurée correspond à la conductance γ du canal et est un indicateur du nombre de canaux présents par unité de surface membranaire.

0.2.3 Répartition ionique de part et d'autre de la membrane

Dans les cellules eucaryotes, la répartition des ions de part et d'autre de la membrane est asymétrique. Ainsi, les ions K^+ sont plus concentrés à l'intérieur de la cellule alors que les ions Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} sont plus représentés à l'extérieur (tab. 1). Ces gradients de concentration sont à l'origine des transferts ioniques par diffusion passive. Le transit de charges du côté intracellulaire vers le côté extracellulaire, et inversement, provoque un déséquilibre engendrant la formation d'une différence de potentiel électrique connue sous le nom de potentiel de membrane (E_m).

0.2.4 Fonctions cellulaires des canaux ioniques

Un changement d'activité des canaux ioniques engendre donc une variation du potentiel de membrane, une modulation des concentrations ioniques intra- et extracellulaires qui induisent ou influencent certaines fonctions cellulaires. Ainsi, les canaux ioniques sont impliqués dans de nombreux phénomènes tels que l'excitation

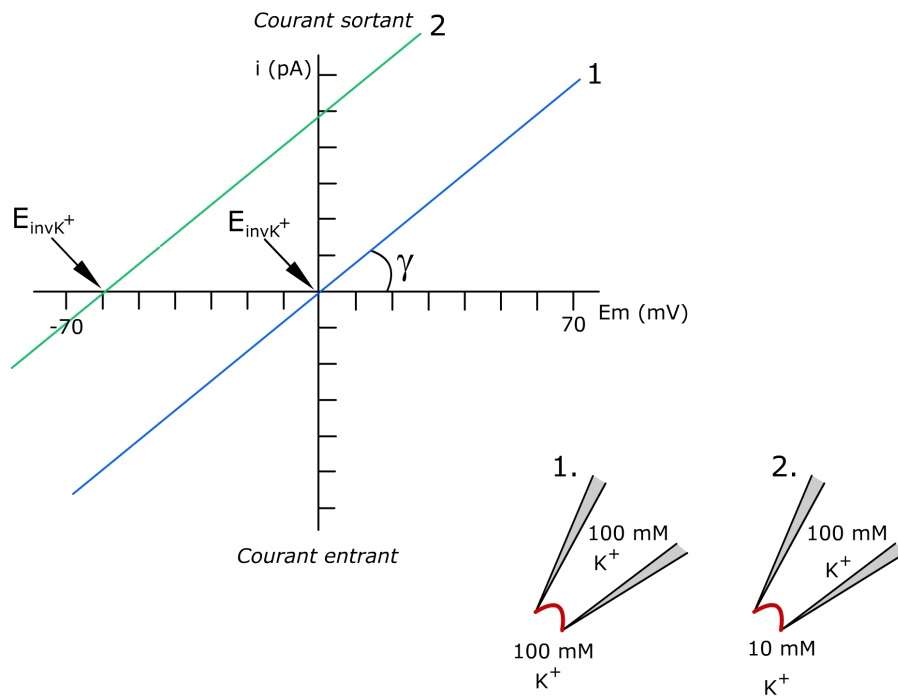


FIGURE 5 – Courbes courant–potentiel. Ce type de courbe s’obtient en appliquant des potentiels croissants (rampe de voltage) à un morceau de membrane ou à une cellule entière. On mesure ensuite le courant correspondant. Dans ces illustrations, les concentrations en K^+ sont d’une part, symétriques (1) et d’autre part, asymétriques (2). (1) Le potentiel d’inversion de K^+ (E_{invK^+}) est égal à la valeur de l’abscisse à l’origine, donc $E_{K^+}=0$ mV. (2) La valeur pour laquelle le potentiel s’inverse est -60 mV et peut également être calculée de manière théorique par le biais de la loi de Nernst. La conductance γ reste la même dans les deux cas de figure.

Espèce ionique	Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
Na^+	5–15 mM	135–145 mM
K^+	140 mM	3,5–5 mM
Cl^-	5–15 mM	110 mM
Ca^{2+}	0,1 μ M	1–2 mM

TABLE 1 – Concentrations extra– et intracellulaires des espèces ioniques libres chez une cellule de mammifère.

(des cellules nerveuses, musculaires), la transmission synaptique (signalisation chimique entre deux neurones ou un neurone et une cellule musculaire), la division cellulaire, la réponse immunitaire (sécrétion de cytokines), la régulation du volume cellulaire. . . Cette importance physiologique explique l'intérêt qui s'est porté à l'étude de leur fonctionnement et de leurs propriétés biophysiques. Pour ce faire, les phénomènes électriques produits par les canaux ioniques sont mesurés à l'aide de techniques dont deux d'entre elles sont décrites en chapitre 6.

Chapitre 1

Les Canaux Potassiques Sensibles à l'ATP

1.1 Bref historique

Les canaux K_{ATP} furent découverts en 1983, par Noma, lorsque celui-ci se rendit compte que les myocytes cardiaques présentaient des courants potassiques inhibés par l'application d'ATP du côté intracellulaire. Par la suite, l'existence de canaux au comportement semblable fut démontrée dans les cellules β du pancréas [54] ainsi que dans les muscles squelettiques [287]. De ce fait, l'effet de l'ATP alors observé est à l'origine du nom "canal K_{ATP} ". La pharmacologie de ces canaux fut ensuite étudiée et ne tarda pas à aboutir à la conclusion qu'ils étaient la cible de substances anti-diabétiques [289] ou encore anti-hypertensives [310]. Dès 1985, Sturgess suggéra que le récepteur des sulfonylurées entraînait dans la composition du canal K_{ATP} [289]. Des études pharmacologiques permirent d'identifier deux types de molécules agissant sur les canaux K_{ATP} : les inhibiteurs (sulfonylurées, ex : glibenclamide) et les activateurs (ex : diazoxide) [347, 68, 265, 264].

Les composants du canal K_{ATP} furent clonés au milieu des années 90. Le premier à ouvrir la voie fut le récepteur des sulfonylurées 1 (SUR1) qui fut cloné à partir de cellules pancréatiques de hamster [4]. La même année, les séquences nucléotidiques de Kir6.1 [132] et Kir6.2 [129] furent élucidées. Un an plus tard, ce fut le tour de SUR2 [130] et SUR2B [134].

Les nouvelles informations apportées par le clonage des isoformes de SUR et de Kir6.x ont marqué le début des études génétiques et l'identification des pathologies associées au dysfonctionnement de ce canal. En outre, la connaissance des séquences de ces protéines a rendu possible l'expression des canaux K_{ATP} dans des systèmes hétérologues facilitant ainsi leur étude.

Localisation tissulaire	Kir6.x	SUR	Références
Cellules β du pancréas	Kir6.2	SUR1	[7, 129, 257]
Muscle squelettique et cardiaque	Kir6.2	SUR2A	[130, 225]
Muscle lisse	Kir6.2	SUR2B	[134]
Muscle lisse vasculaire	Kir6.1	SUR2B	[277]
Cerveau	Kir6.2	SUR1	[150]

TABLE 1.1 – Localisation tissulaire des isoformes de SUR et Kir6.x, d’après Seino *et al.* [273]).

1.2 Propriétés des canaux K_{ATP}

1.2.1 Composition et stœchiométrie des canaux K_{ATP}

L’association de deux sous-unités est à l’origine de la formation du canal K_{ATP} (fig. 1.1) : le récepteur des sulfonylurées (SUR, ~ 140 - 170 kDa) et le canal potassique rectifiant entrant (Kir6.x, ~ 40 kDa). Il existe deux gènes codant pour SUR chez les mammifères, *abcc8* (SUR1) et *abcc9* (SUR2), localisés sur deux chromosomes différents (11 et 12 respectivement). Les deux isoformes de SUR2, SUR2A et SUR2B sont obtenues par épissage alternatif au niveau des deux derniers exons du gène. On dénombre deux isoformes de Kir6.x : Kir6.1 et Kir6.2, codés par les gènes *kcnj8* et *kcnj11*, respectivement. Chez l’Homme, leurs gènes sont situés sur les chromosomes 12 et 11, respectivement. De ce fait, Kir6.1 et SUR2 sont localisés sur le même chromosome, sous l’influence de promoteurs différents, tout comme Kir6.2 et SUR1.

La topologie du canal K_{ATP} a été mise en évidence grâce à l’utilisation de protéines de fusion SUR1–Kir6.2 et SUR1–Kir6.2–Kir6.2 [53]. Des expériences de co-purification de SUR1 et Kir6.2 ont de plus montré que les deux sous-unités étaient associées. La protéine de fusion SUR1–Kir6.2 est capable de former un canal K_{ATP} fonctionnel ayant des propriétés semblables au canal natif. Elle constitue un complexe de 950 kDa, ce qui correspond à la somme des masses moléculaires de quatre Kir6.2 et quatre SUR1. Des expériences complémentaires ont permis de confirmer que le canal K_{ATP} présente une stœchiométrie 1 :1 [53]. Cet ensemble présente l’architecture suivante : les quatre Kir6.2 se situent au centre constituant ainsi le pore du canal, lequel est entouré par les quatre sous-unités SUR [53, 131, 281] (fig. 1.1). Cette hypothèse est également appuyée par la structure tridimensionnelle à basse résolution (18 Å) du canal obtenue par microscopie électronique qui met en évidence un pore central (Kir6.2) englobé par quatre SUR [193].

Au sein de ce complexe, SUR est capable de réguler l’activité du canal. La présence à la membrane du canal K_{ATP} fonctionnel repose sur cette association octa-mérique [129]. De plus, suivant les tissus dans lesquels le canal K_{ATP} est exprimé, différentes isoformes de Kir6.x et SUR sont impliquées (cf. tableau 1.1).

1.2.2 Assemblage et adressage membranaire

La formation de ce complexe octamérique requiert un contrôle très strict qui est jalonné par différentes étapes. Tout d'abord, il a été démontré, sur la base du calcul du temps de demi-vie de chaque sous-unité, que celles-ci s'assemblent probablement suivant la séquence ci-après : un Kir6.2 et un SUR1 s'associent pour former un hétérodimère et ces derniers se rencontrent pour constituer un tétramère de SUR1/Kir6.2 [59]. Plusieurs zones d'interaction entre les deux composants du canal K_{ATP} ont été identifiées et certaines d'entre elles sont suspectées comme ayant un rôle dans sa biogenèse. Ainsi, Rainbow *et al.* ont constaté qu'un fragment de SUR2A, situé entre les domaines TMD2 et NBD2 et plus exactement entre les acides aminés 1294 et 1358, coprécipitait avec Kir6.2. En outre, la coexpression de ce fragment avec SUR2A et Kir6.2 altère l'adressage du canal natif [244, 245]. Le domaine TMD0 a également la capacité de s'associer avec Kir6.2 et modifie son activité [46, 81, 20]. La partie C-ter de Kir6.2 a aussi été reconnue comme étant impliquée dans l'interaction entre les deux sous-unités du canal K_{ATP} [90, 270].

Le réticulum endoplasmique (RE) possède un système de contrôle qualité très drastique, et le canal K_{ATP} se doit de montrer patte blanche pour pouvoir accéder à la membrane plasmique par la suite. Sur chacune des sous-unités se trouve un signal de rétention au RE (RXR) qui, lorsqu'il est accessible à la protéine COPI (Coat Protein Complex 1), l'empêche de sortir du RE (fig. 1.1). L'observation selon laquelle une forme tronquée de Kir6.2 ($\Delta C36$) est capable d'atteindre la membrane en absence de SUR s'est justifiée par le fait que ce fragment contient le signal de rétention RKR [314]. De plus, la présence d'un signal semblable, entre les domaines TMD1 et NBD1 de SUR1, fut établie [341]. Ainsi, il semblerait que SUR1 masque, par encombrement stérique, le signal RKR présent sur Kir6.2 [116]. Reste alors le signal de rétention porté par SUR1 qui serait pris en charge par un dimère de la protéine 14-3-3 [340]. En effet, 14-3-3 reconnaîtrait le signal de rétention de SUR1, le masquant ainsi. Ceci réduit alors l'accès de ces sites à COPI qui laisse s'échapper le complexe octamérique du RE [116].

1.3 Les canaux potassiques rectifiants entrants : Kir

1.3.1 Caractéristiques principales des canaux Kir

1.3.1.1 Les différents membres de la famille Kir

La famille des canaux Kir est composée de quinze membres. Elle est divisée en sept sous-familles (Kir1.x à Kir7.1) suivant leur homologie de séquence (fig. 1.2). Ils ont comme rôle commun de maintenir le potentiel membranaire proche du potentiel de repos et de transporter les ions K^+ au travers des membranes [218, 74]. Kir1.1

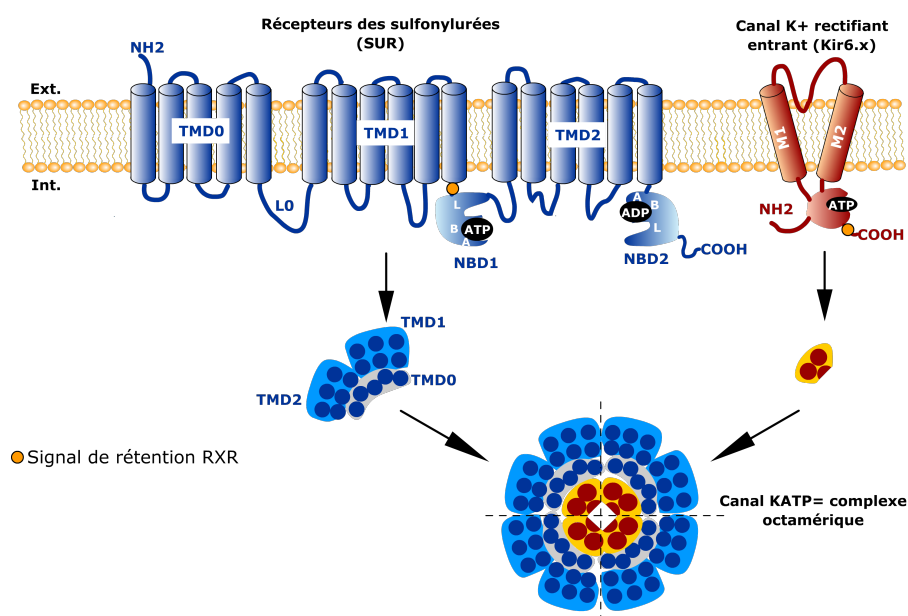


FIGURE 1.1 – Topologie du canal K_{ATP} . SUR est composé de trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1, TMD2) et de deux domaines de liaison des nucléotides (NBD1 et NBD2) présentant les séquences consensus A et B de Walker et le lien L (signature de la famille ABC). Kir6.2 possède deux hélices transmembranaires (M1 et M2) ainsi qu'un site de liaison des nucléotides. Le signal de rétention RXR (rond jaune) empêche les deux sous-unités d'atteindre la membrane plasmique lorsqu'elles ne sont pas associées.

est chargé du transport de K^+ au niveau du rein, les Kir2.x contrôlent le potentiel de repos des cellules cardiaques et cérébrales. La sous-famille Kir3.x possède la particularité d'être activée par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques. Ces canaux peuvent ainsi transposer l'activation de certains GPCR en activité électrique, et ce, dans les cellules cardiaques, neuronales ou encore les cellules sécrétrices neuronales [336]. Kir6.1 et Kir6.2 constituent, associés à SUR, le canal K_{ATP} qui est régulé par les nucléotides cytosoliques. Ils permettent de coupler le métabolisme cellulaire à l'activité électrique et au flux de K^+ [14]. Ils assurent ainsi la régulation de la libération d'insuline, agissent en réponse à l'ischémie cardiaque ou neuronale ou régulent le tonus vasculaire des muscles lisses (cf. section 1.5.2). Les sous-familles Kir4.x, Kir5.1 et Kir7.1 auraient un rôle de transport d'ions K^+ et plus particulièrement de recyclage de ces derniers. A titre d'exemple, le canal Kir4.1 est exprimé dans le système nerveux central, la cochlée ou encore dans les reins. Leur activité dans cet organe serait liée à celle de la pompe Na^+/K^+ ATPase. En effet, Kir4.1 est plus précisément exprimé dans les cellules du néphron distal et assurerait la réabsorption de sel (des urines vers le sang) en association avec la Na^+/K^+ ATPase [266]. Kir5.1, quant à lui, s'associe avec Kir4.1 et est exprimé dans les cellules astrogliales et les cellules rétinienne de Müller. Ce canal aurait pour rôle la régulation de la concentration extracellulaire de K^+ afin d'assurer la bonne fonction des neurones environnants [117]. Enfin, Kir7.1 est exprimé dans les cellules épithéliales et posséderait un rôle de recyclage des ions potassium [212]. Le lien qui unit ces canaux potassiques est le fait qu'ils présentent une propriété commune : la rectification entrante des courants.

1.3.1.2 La rectification

La rectification entrante est l'une des caractéristiques des canaux Kir. Cela signifie qu'ils conduisent mieux les ions potassium dans le sens entrant que sortant (fig. 1.3). En conditions physiologiques, lorsque la membrane est dépolarisée, la conductance des canaux Kir est faible alors qu'en cas d'hyperpolarisation, l'entrée des ions K^+ est favorisée. L'explication de ce mécanisme réside dans la liaison de cations (Mg^{2+} et polyamines) au niveau des domaines transmembranaires et cytoplasmiques de Kir. Ils bloquent le passage des K^+ de façon voltage dépendante [176]. Ces cations interagiraient avec des résidus situés au niveau du segment M2 et de la partie C-terminale du canal.

Tous les Kir ne possèdent pas les mêmes propriétés de rectification. En effet, au moins un résidu, qui se trouve au niveau de la partie transmembranaire M2 permet de déterminer si la rectification est faible (Kir1.1 et Kir6.x), forte (Kir2.x et Kir3.x) ou intermédiaire (Kir4.x). Ainsi, Kir2.1, qui possède un résidu chargé négativement (Asp) en position 172, est rectifiant fort, alors que Kir1.1, qui a une Asn (neutre)

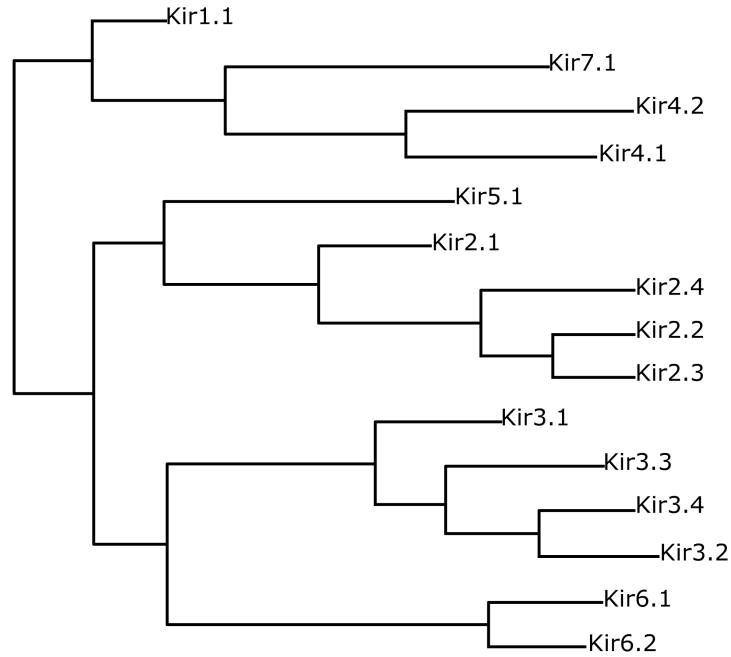


FIGURE 1.2 – Arbre phylogénétique des 15 membres de la famille Kir, d’après Hibino *et al.* [117].

en position 171, est faible. Néanmoins, la mutation de ce résidu en Asp permet de transformer ce dernier en canal présentant une forte rectification [178, 288]. Cet acide aminé (site D/N) est en fait un des sites d’interaction des cations avec le canal.

1.3.1.3 Caractéristiques structurales

Les canaux Kir possèdent deux hélices transmembranaires (M1 et M2), une région formant le pore, H5 et des domaines C-terminal et N-terminal cytoplasmiques. H5 constitue le filtre de sélectivité et contient, tout comme les autres canaux potassiques, la séquence TXGY(F)G [32]. Les Kir forment des homotétramères (4 sous-unités identiques) ou des hétérotétramères (sous-unités distinctes) [243, 133]. En général, le phénomène d’hétéromérisation a lieu entre deux membres de la même sous-famille (*e.g.* Kir3.1 avec Kir3.4, Kir3.2 ou Kir3.3), à l’exception de Kir4.1 et Kir5.1 qui s’associent dans les astrocytes. La possibilité de former ainsi des combinaisons aboutit à des canaux Kir présentant des propriétés biophysiques différentes. Parmi la famille des canaux Kir, Kir6.1 et Kir6.2 sont des membres à part puisqu’ils interagissent avec la sous-unité régulatrice SUR pour former le canal K_{ATP} .

Structure générale des canaux potassiques Le fait que les canaux potassiques présentent des traits communs, à l’origine de leur sélectivité, permet d’utiliser les

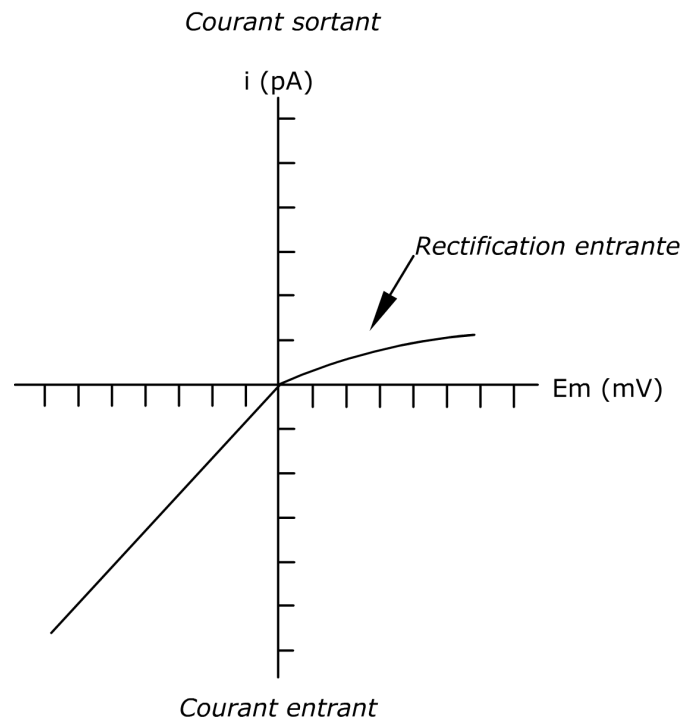


FIGURE 1.3 – Courbe i - V d'un canal rectifiant entrant. Le courant entrant est plus important que le courant sortant. A des potentiels positifs (dépolarisation membranaire), le courant est faible tandis que celui-ci augmente en conditions hyperpolarisantes (potentiels négatifs).

structures de divers canaux pour élucider leur fonctionnement général (conduction des ions et mécanisme d'ouverture/fermeture). Tout d'abord, la résolution de la structure du canal pH/voltage-dépendant KcsA de *Streptomyces lividans* [75] a apporté de nombreux éléments concernant l'architecture des canaux potassiques (partie transmembranaire), mais aussi concernant le mécanisme de conduction des ions. Ainsi, la structure de KcsA a mis en évidence la présence de quatre sous-unités identiques, constituées de deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2), l'une externe (éloignée du pore) et l'autre orientée vers l'intérieur du pore. Elles sont reliées par une hélice ("pore helix") qui présente une boucle de trente acides aminés en C-ter. Elle se trouve sur le trajet des ions et contient la signature des canaux potassiques TV-GYG. En outre, une cavité de 10 Å remplie de molécules d'eau se situe à mi-chemin du parcours de l'ion au travers du pore (fig. 1.4) [345]. La présence de cette poche, associée à celle des résidus chargés négativement, assure la stabilisation de l'ion au cours de son cheminement au sein du canal.

En solution aqueuse, K^+ est entouré par une couche de molécules d'eau permettant ainsi de le stabiliser. Lorsque celui-ci se présente à l'entrée du canal, l'affinité pour les molécules d'eau diminue tandis que celle pour le site de liaison le plus proche au sein du pore augmente. L'ion potassium est alors déshydraté. C'est sous cette forme qu'il transite à travers le canal. Les sites de liaisons sont constitués par les oxygènes des groupes carboxyles et hydroxyle des résidus du filtre de sélectivité et sont au nombre de huit. Ces oxygènes sont arrangés de manière à mimer la disposition de ceux de l'eau autour de K^+ au niveau de la cavité centrale. De cette manière, l'énergie nécessaire à la déshydratation est totalement compensée.

Deux stratégies sont à l'origine de la diffusion rapide des ions au niveau du canal :

- **Force de répulsion qui existe entre deux ions K^+ .** En moyenne, deux ions potassium cohabitent dans le filtre de sélectivité (en positions 1,3 ou 2,4, cf. fig. 1.5) et sont séparés par une molécule d'eau. La force de répulsion étant plus importante que l'affinité pour le site, l'ion voisin est capable de chasser celui qui est localisé au niveau du site $n+1$ [202, 344]. Ainsi, l'entrée d'un ion dans le filtre provoque la sortie d'un autre qui est alors à nouveau solvaté (fig. 1.4).
- **Conformation du filtre de sélectivité.** Lorsque la concentration en potassium est faible, le filtre de sélectivité possède une conformation distincte de celle observée en cas de concentration élevée. Un seul ion K^+ se lie de manière forte diminuant ainsi la vitesse de conduction [345, 182]. Lorsqu'un deuxième ion K^+ se positionne dans le filtre de sélectivité, une partie de l'énergie de liaison est utilisée pour modifier la structure du filtre de sélectivité. Ainsi, l'énergie de liaison de l'ion à son site est moins forte assurant une diffusion rapide.

La comparaison de deux structures de canaux potassiques dans deux configu-

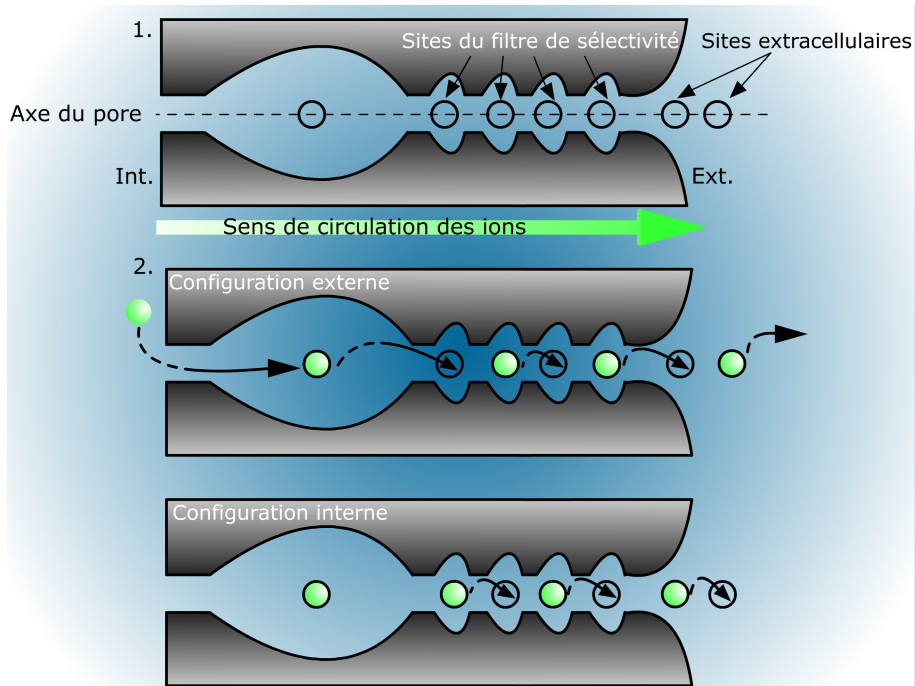


FIGURE 1.4 – Circulation des ions au niveau du filtre de sélectivité de KcsA. (1) Le pore posséderait sept sites d'interaction pour les ions potassium (représentés par un cercle noir). (2) Deux configurations possibles (interne et externe) sont envisagées.

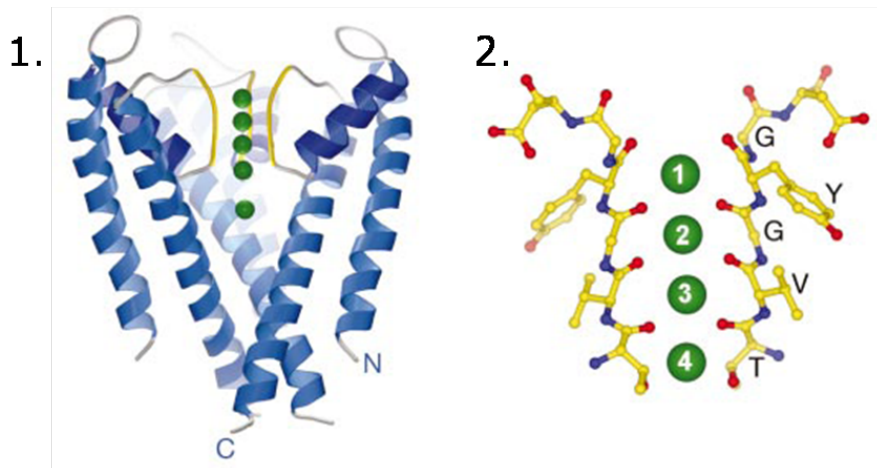


FIGURE 1.5 – Filtre de sélectivité du canal KcsA. Deux dispositions possibles sont supposées pour les ions K^+ : 1,3 et 2,4.

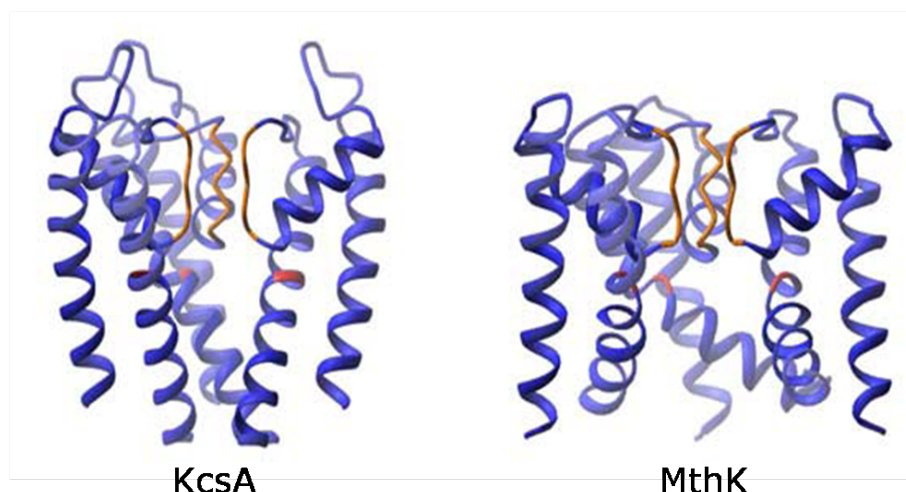


FIGURE 1.6 – Structures de KcsA et MthK, KcsA présente un rétrécissement côté cytoplasmique tandis que les hélices TM2 de MthK sont éloignées suite à un changement de conformation d’une glycine conservée (en rouge), d’après MacKinnon [182].

rations distinctes (ouvert : MthK [140], fermé : KcsA) a permis d’avancer dans la compréhension du mécanisme d’ouverture et de fermeture des canaux potassiques. Tout d’abord, MthK est un canal régulé par le calcium tandis que KcsA est régulé par le voltage ou encore le pH. Par conséquent, ils possèdent des propriétés structurales en relation avec leur mode de régulation qui ne sont pas prises en compte lors de la comparaison [141]. Ainsi, les différences observées au niveau de pore de ces deux canaux soulignent un rétrécissement côté intracellulaire pour KcsA et une ouverture pour MthK (fig. 1.6). Dans le premier cas, la diminution du diamètre du pore et la présence d’acides aminés hydrophobes dans cette région jouent un rôle de barrière, empêchant le passage des ions K^+ . Concernant MthK, les hélices internes sont courbées au niveau d’une Gly (conservée au sein des canaux potassiques) ce qui assure une ouverture du côté cytoplasmique. Cette glycine correspond à une sorte de charnière permettant la transition entre l’état ouvert et fermé.

D’autres structures ont été résolues depuis celles de KcsA [75] et MthK [140] ajoutant ainsi de nouvelles pièces au puzzle de la grande famille des canaux potassiques : KvAP et Kv1.2, représentant les canaux voltage-dépendant [142, 175], Kirbac1.1, Kirbac3.1 et Kir2.2, appartenant à la famille des canaux rectifiant entrants [161, 221, 304]. Tous ces canaux partagent une structure de pore commune contrairement aux autres régions qui présentent une variabilité structurale importante.

Structures de la famille Kir Comme abordé précédemment, la région transmembranaire des canaux Kir possède les mêmes caractéristiques que celles des canaux potassiques appartenant aux autres familles.

Dans la structure de Kirbac1.1 en conformation fermée [161], obtenue à une résolution de 3,65 Å, on distingue : deux hélices α (TM1, externe et TM2, interne) qui constituent la région transmembranaire du canal et un domaine intracellulaire principalement formé par des feuillets β . Cette structure met également en évidence l'hélice du pore ("pore helix") que l'on retrouve chez KcsA et une hélice membranaire supplémentaire, la "slide helix" (fig. 1.7). L'architecture de Kirbac1.1 peut être divisée en cinq régions : le filtre de sélectivité, la cavité, la porte, les liens flexibles et le vestibule cytoplasmique. Les chaînes latérales de la Phe148, située au niveau de la face intracellulaire, semblent être responsables du blocage du flux d'ion et formeraient la "porte d'activation". En outre, on dénombre seulement trois ions K^+ dans le filtre de sélectivité. Ceci correspond à la moyenne de deux configurations : l'une comprenant un ion (position 2) et l'autre deux (positions 1,3). Kuo *et al.* ont proposé une hypothèse afin d'expliquer le mécanisme de fermeture et d'ouverture de Kirbac1.1 impliquant le mouvement relatif de tous les composants du canal. Le mouvement vers l'extérieur des domaines intracellulaires permettrait d'ouvrir le vestibule cytoplasmique en déplaçant l'extrémité des hélices TM2 tandis qu'une translation de la "slide helix" assurerait le déplacement des hélices TM1. De cette manière, l'hélice TM2 peut se courber (au niveau d'une Gly conservée) sans contrainte.

La structure du canal Kir3.1 chimérique a été déterminée en remplaçant les trois quarts du pore de Kir3.1 de souris par la zone correspondante du canal bactérien Kirbac3.1 [221]. La comparaison de la structure du filtre de sélectivité de Kir3.1 avec celui de KcsA témoigne de la conservation de l'architecture de cette région. Ce point montre l'importance de la structure de ce filtre dans la sélectivité aux ions potassium. De surcroît, deux conformations du pore cytoplasmique sont disponibles, l'une où le pore est fermé, ne pouvant pas laisser passer les ions K^+ et l'autre suffisamment ouverte pour permettre le passage de ces derniers. Ces deux conformations sont étroitement liées au mouvement de la "G-loop" (boucle située en haut du vestibule cytoplasmique se trouvant sur le passage de l'ion) qui pourrait jouer un rôle de porte supplémentaire du canal.

Enfin, la structure récemment résolue de Kir2.2 de poulet [304] confirme la conservation de la structure du filtre de sélectivité. Cependant, à la différence des deux premières structures de Kir, l'existence de ponts disulfure assurerait la stabilisation du filtre. En outre, contrairement à ce qui a été observé avec la chimère de Kir3.1/Kirbac3.1, le mouvement de la boucle G ne serait pas associé à celui des domaines cytoplasmiques. La structure fournit aussi des bases structurales expliquant la propriété de rectification des canaux Kir et des informations sur la faible sensibilité

de ces canaux aux toxines (fig. 1.7) [304].

1.3.1.4 Régulation des canaux Kir

Les canaux Kir sont régulés par différents facteurs tels que le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), l'ATP, le pH ou encore par l'intervention de protéines partenaires (sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques, récepteur des sulfonurées).

PIP₂ Le PIP_2 est un phospholipide ancré à la membrane qui est impliqué de manière universelle dans la régulation des canaux Kir. Il est à l'origine de la perte d'activité ("run-down") observée lors de mesures de courant sur un "patch" de membrane excisé. En effet, la diminution progressive du stock de PIP_2 a pour conséquence une baisse de l'activité du canal. Ainsi, l'ajout de MgATP intracellulaire permet de restaurer la quantité de PIP_2 à la membrane grâce à des lipides kinases [119] et rétablit ainsi l'activité du canal. Le PIP_2 interagit avec des résidus chargés positivement situés en C-ter et N-ter (fig. 1.8) [127, 177]. Le PIP_2 intervient également dans la régulation des canaux Kir de manière indirecte. En effet, il est nécessaire à l'activation des Kir3.x par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques [290]. Ce phospholipide modifie à la baisse la sensibilité du canal K_{ATP} à l'ATP (cf. section 1.3.2.3).

Phosphorylation La phosphorylation de certains Kir par des protéines kinases (PKC, PKA) a différents effets sur leurs propriétés d'ouverture. A titre d'exemple, l'ajout de groupements phosphate par la PKC au niveau de Ser de Kir1.1 a pour conséquence l'inhibition du canal [172]. Un autre exemple est celui de Kir6.1 (muscle lisse), qui, lorsqu'il est phosphorylé par la PKA voit son activité augmenter (fig. 1.9) [242, 275].

Interactions protéines-protéines Certaines protéines peuvent interagir avec des canaux Kir modulant leur activité ou déterminant leur localisation membranaire. Ainsi, les canaux Kir3.x sont régulés positivement par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques, le récepteur des sulfonurées peut modifier le "gating" de Kir6.x via ses régions cytoplasmiques (fig. 1.9). En outre, certaines protéines d'ancrage telles que PSD95 ou SAP97 régulent la localisation de Kir à la membrane [124, 226, 180].

Autres D'autres facteurs peuvent influencer l'activité : le pH intracellulaire et extracellulaire pour les canaux Kir1.1, Kir2.3 et ceux contenant la sous-unité Kir4.1, une acidification du pH ayant en général pour conséquence la fermeture du canal.

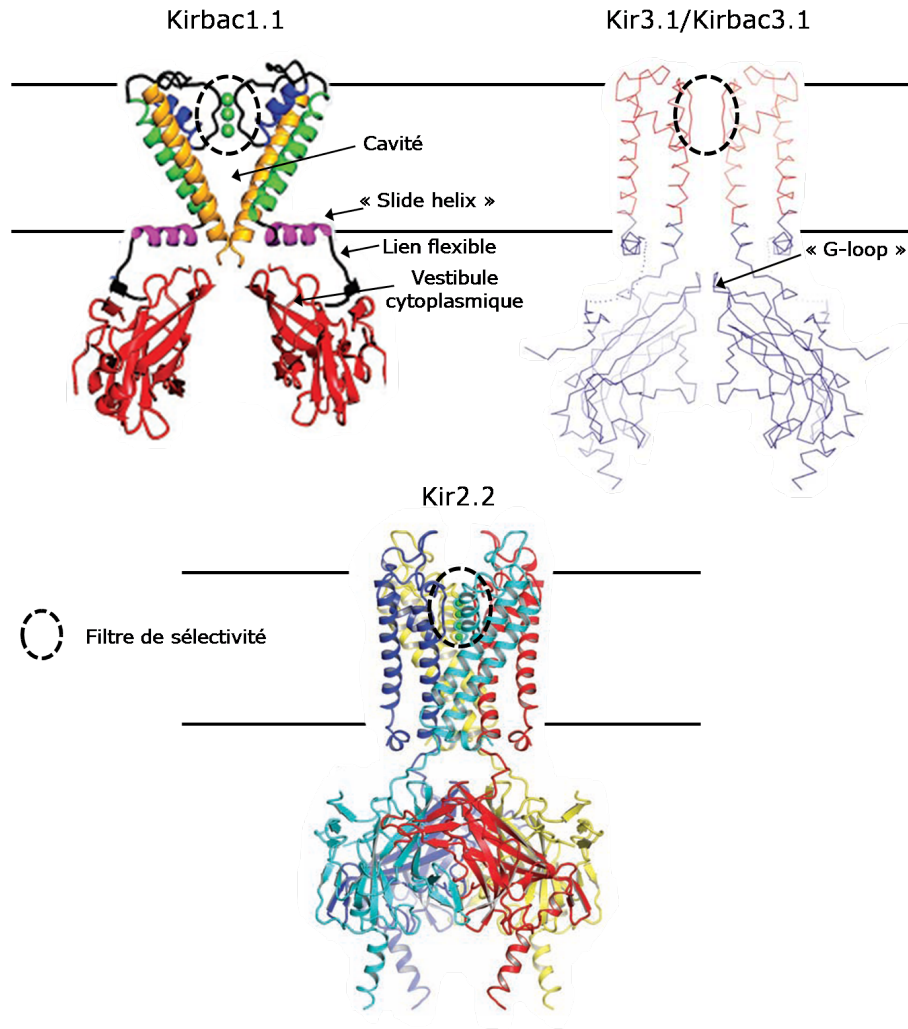


FIGURE 1.7 – Structures des canaux Kirbac1.1 [161], Kir3.1 chimérique [221] et Kir2.2[304]. Le filtre de sélectivité est entouré en pointillés. On distingue cinq régions : le filtre de sélectivité, la cavité, la "slide helix", les liens flexibles et le vestibule cytoplasmique.

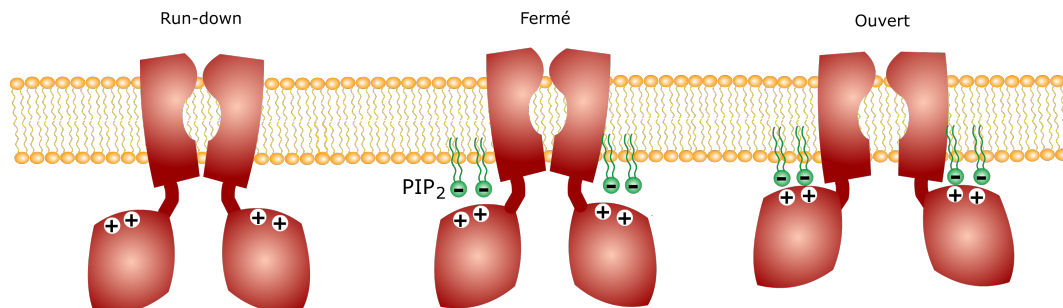


FIGURE 1.8 – Régulation du "gating" des canaux Kir par PIP₂. Transition entre un canal subissant du "run-down", l'état fermé et ouvert.

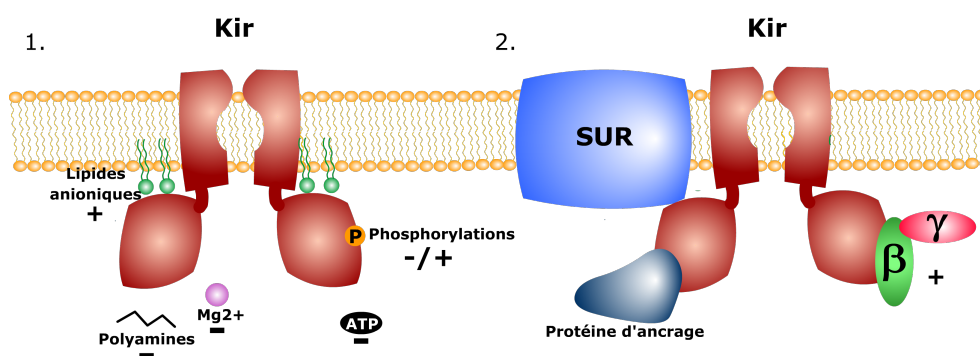


FIGURE 1.9 – Récapitulatif des différents acteurs de la régulation des canaux Kir. (1) Régulation des canaux Kir par des petites molécules (ions, polyamines, PIP_2 , phosphate). Les signes (+) et (-) symbolisent une activation et une inhibition respectivement. (2) Interactions protéine-protéine impliquées dans la régulation des canaux Kir. Les protéines concernées sont le récepteur des sulfonyles (SUR) ou encore les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques.

Les ions Na^+ ont un effet positif sur les canaux Kir3.2 et Kir3.4 [120, 233]. Un autre exemple est celui de l'ATP qui inhibe Kir6.x (cf. section 1.3.2.3).

1.3.2 Lumière sur les canaux Kir6.1 et Kir6.2

1.3.2.1 Caractéristiques Structurales

Les canaux Kir6.x possèdent une particularité de séquence au niveau du filtre de sélectivité. En effet, la séquence TXGYG est remplacée par TXGFG. De plus, Kir6.2 et Kir6.1 sont des canaux potassiques rectifiant faibles, ce qui s'explique par la présence d'une asparagine (en position 160 pour Kir6.2) au niveau du site D/N (cf. section 1.3.1.2). La mutation de ce résidu en aspartate dans Kir6.2 donne lieu à une rectification forte [281].

1.3.2.2 Localisation tissulaire

Kir6.1 Kir6.1 est exprimé de façon ubiquitaire et de manière plus soutenue au niveau des cellules musculaires lisses dans lesquelles il ne côtoie pas l'autre isoforme, Kir6.2 [297]. En outre, des expériences d'immunomarquage et de microscopie électronique ont montré la présence de Kir6.1 dans les membranes internes des mitochondries [296]. Toutefois, cette observation est actuellement remise en question à cause de résultats contradictoires obtenus par différentes équipes [216, 51, 84]. L'expression de Kir6.1 serait de plus induite suite à une ischémie cardiaque [5].

Kir6.2 Kir6.2 est fortement représenté dans les cellules α , β , γ des îlots pancréatiques [295] et, dans une moindre mesure, dans le cœur, les muscles squelettiques ou encore dans le cerveau [150].

1.3.2.3 Régulation physiologique

Les nucléotides L'observation selon laquelle le canal Kir6.2 tronqué de 26 résidus en C-ter (*i.e.* sans signal de rétention) pouvait accéder seul à la membrane, a mené à la conclusion qu'il pouvait être inhibé de manière directe par l'ATP [314]. L'identification du site de fixation de l'ATP fut laborieuse étant donné l'absence de séquence signature des sites de liaison des nucléotides. En effet, il a fallu combiner des études impliquant la mutagenèse des régions N-ter et C-ter cytoplasmiques aux informations apportées par les structures de canaux Kir alors disponibles [161, 222]. Ainsi, un site de liaison de l'ATP a été identifié à l'interface entre deux sous-unités Kir6.2 adjacentes, mettant en jeu le domaine C-ter de l'une et le N-ter de l'autre [73, 11]. Par la suite, il a été montré que la liaison d'une seule molécule d'ATP sur une sous-unité Kir6.2 était suffisante à la fermeture du canal [185]. De plus, Il s'agit d'un site très sélectif puisqu'il ne tolère pas de modification, même minime, du noyau adénine [63] et que l'affinité de liaison décroît avec la diminution du nombre de phosphates [313, 251]. SUR modifie la sensibilité à l'ATP de Kir6.2. En effet, l'IC₅₀ de l'ATP pour Kir6.2 se situe aux environs de 200 μ M alors que, en présence de SUR, celle-ci est déplacée vers 10 μ M.

Les lipides Tout comme pour l'ensemble des canaux Kir, le PIP₂ joue un rôle central dans la régulation du "gating" de Kir6.2 et Kir6.1. Il permet non seulement d'atténuer le phénomène de "run-down" [119, 79] mais diminue aussi l'affinité apparente de l'ATP pour Kir6.2 modifiant ainsi son pouvoir inhibiteur [282, 28, 80]. Le PIP₂ interagit de manière électrostatique avec Kir6.2 au niveau de résidus chargés positivement et localisés en C-ter, à proximité du site de fixation de l'ATP [78, 279].

Une autre famille de lipides anioniques est impliquée dans la régulation de Kir6.x. Il s'agit des esters d'acides gras à longue chaîne associés au Co-enzyme A (LC-CoA). S'appuyant sur un mécanisme semblable à celui du PIP₂, ils diminuent le "run-down" et la sensibilité à l'ATP [96, 41, 278].

Phosphorylation La PKA et la PKC modulent l'activité de Kir6.x en phosphorylant certains résidus Ser/Thr. Ainsi la phosphorylation par la PKA du canal K_{ATP} contenant Kir6.2 et SUR1 a un effet positif [30]. Il en est de même pour Kir6.1 + SUR2B [242]. Les résidus S372 et T224 de Kir6.2 et S385 de Kir6.1 ont été identifiés comme étant des sites de phosphorylation de la PKA [30, 242, 173] tandis que seul le résidu T180 de Kir6.2 a été montré comme étant la cible de la PKC [170].

Influence du pH L'effet du pH sur l'activité des canaux Kir6.x revêt trois aspects :

- Lors d'une acidification modérée, on observe une activation.
- Une acidification importante provoque l'inactivation du canal.
- La basification du milieu a pour conséquence une augmentation de la rectification.

Quand le pH diminue, il est possible d'observer, dans un premier temps, une activation réversible ($pK_a \sim 7.2$) qui est suivie par une inactivation irréversible ($pK_i \sim 6.8$) [333]. La phase d'activation est le résultat de la réduction du temps de fermeture des canaux [330]. L'activation fait intervenir le résidu His175 qui se situe au niveau de l'hélice M2 et l'inactivation implique les His186, 193, 216 qui sont localisées dans la partie C-ter cytoplasmique [334]. L'augmentation de la rectification constatée en cas de basification est supportée par la déprotonation de H216 [29].

1.4 SUR, un transporteur ABC à part

1.4.1 La grande famille des transporteurs ABC

Le récepteur des sulfonylurées (SUR) appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ces protéines membranaires ont pour mission de transporter des substrats de part et d'autre d'une bicouche lipidique. Chez les procaryotes, elles assurent l'incorporation de nutriments essentiels ainsi que l'expulsion de certaines substances toxiques. De cette manière, ces protéines sont, par exemple, impliquées dans des phénomènes de résistance aux antibiotiques. Chez l'Homme, de nombreux mutants sont responsables de certaines maladies héréditaires telles que la mucoviscidose ou encore la maladie de Tangier. De surcroît, leur rôle dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie a été démontré maintes fois. Plus de 1000 transporteurs ABC ont été répertoriés jusqu'à présent, ce qui en fait l'une des plus grandes familles de protéines membranaires.

1.4.1.1 Membres

Il existe sept sous-familles de transporteurs ABC eucaryotes (de A à G), cette classification étant basée sur l'homologie présentée par les différentes régions ABC.

ABCA La sous-famille ABCA possède douze membres, classés en deux sous-groupes. Le premier contient ABCA1, 2, 3, 4, 7, 12 et le second ABCA5, 6, 8, 9, 10, 11. Les gènes codants pour ces derniers sont rassemblés au niveau du chromosome 17 humain. Il s'agit des plus grands transporteurs ABC connus puisque certains comptent plus de 2000 acides aminés. Leur arrangement correspond à celui de transporteurs "complets" (*i.e.* TMD1–NBD1–TMD2–NBD2, fig.1.10). La majeure partie

de ces protéines est impliquée dans le transport des lipides et est exprimée dans différents organes (*e.g.* rétine, ABCA4 ; intestin, ABCA1). En outre, certains membres comme ABCA2 confèrent, aux lignées cellulaires les exprimant, une résistance aux médicaments.

ABCB Cette sous-famille est composée de douze membres, quatre sont des transporteurs complets (dont ABCB1 aussi appelé MDR1 pour "MultiDrug Resistance" 1), possédant donc un arrangement TMD1–NBD1–TMD2–NBD2 et sept sont des "demi-transporteurs", TMD–NBD (fig. 1.10). ABCB1 est exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique ou encore dans le foie. Il permet à certaines lignées cellulaires cancéreuses de résister à la chimiothérapie. ABCB2 et ABCB3 forment des hétérodimères impliqués dans le transport des antigènes avant leur présentation par les molécules CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I.

ABCC La sous-famille ABCC présente treize membres, certains possédant un domaine transmembranaire N-terminal supplémentaire, TMD0. CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator" ou ABCC7) est un canal chlore régulé par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, SUR1 et SUR2 (ou ABCC8, ABCC9) sont les sous-unités régulatrices du canal K_{ATP} . Des mutations de CFTR sont responsables de la mucoviscidose. Les autres membres sont des transporteurs similaires à MRP1, qui sont répartis dans deux sous-groupes : MRP1, 2, 3, 6, 7, qui possèdent un domaine TMD0 et MRP4, 5, 8, 9, 10 qui n'en possèdent pas. Ils sont capables de transporter des métaux lourds, des médicaments, des nucléosides...

ABCD Les demi-transporteurs ABCD sont au nombre de quatre. Ils sont essentiellement exprimés dans le peroxisome dans lequel ils forment des homo ou hétérodimères. ALDP (ABCD1) a été identifié comme transporteur d'esters d'acides gras à très longue chaîne associés au coenzyme A. Des mutants causeraient une maladie héréditaire liée au chromosome X : l'adrenoleucodystrophie.

ABCE/F Les membres de ces deux familles ne présentent pas de domaine transmembranaire mais possèdent un ou deux NBD. On ne leur connaît aucune fonction de transport. La famille ABCE ne comprend qu'un seul membre avec un NBD : OABP ("oligo-adenylate binding protein"). Cette protéine est synthétisée en réponse à une infection virale. Les protéines appartenant à la famille ABCF sont composées de deux NBD (fig.1.10). Chez l'Homme, ABCF1 aurait pour rôle d'activer une kinase, et ce, en association avec le ribosome [315].

ABCG Les demi-transporteurs qui constituent cette famille ont une topologie inversée : NBD–TMD. Chez les mammifères, ABCG1 est responsable du transport de

cholestérol [155], ABCG5 et 8 transportent des stérols dans le foie et l'intestin.

1.4.1.2 Caractéristiques structurales des transporteurs ABC

Les domaines transmembranaires : TMD Les différentes structures de transporteurs ABC disponibles témoignent d'une grande variabilité au niveau des domaines transmembranaires (fig.1.11). En effet, d'un ABC à l'autre, la séquence, la taille, l'architecture et le nombre de TMD varient. De manière générale, les exporteurs ABC comptent douze hélices α transmembranaires tandis que les importeurs ABC possèdent entre dix et vingt hélices transmembranaires.

Les domaines de liaison de nucléotides : NBD Les NBD correspondent à la partie la plus conservée au sein des transporteurs ABC. C'est d'ailleurs eux qui permettent de déterminer l'appartenance d'une protéine candidate à cette famille. Ils contiennent plusieurs séquences consensus, chacune ayant des fonctions spécifiques [143]. Le motif A de Walker est situé au niveau du sous-domaine "RecA-like" (une enzyme de réparation de l'ADN chez *E. coli*) et LSGGQ (signature ABC) se trouve dans le sous-domaine hélicoïdal. Dans le cas des transporteurs dits "complets", les deux NBD s'assemblent de manière à disposer ces motifs tête-bêche. Ainsi, cet arrangement engendre la formation de deux domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, associant le motif A de Walker d'un NBD avec le LSGGQ de l'autre. La liaison de l'ATP provoque le rapprochement des deux NBD [48].

Hélices de couplage La transmission des changements conformationnels au niveau des NBD, induits par la liaison d'ATP, vers les TMD serait possible grâce à la présence d'une hélice α entre ces deux domaines. En effet, l'observation des structures des exporteurs Sav1866, MsbA et P-gp [66, 324, 9] montre la présence d'une hélice à ce niveau, interagissant avec le NBD opposé (*i.e.* l'hélice présente dans TMD1-NBD1 est en contact avec NBD2). Il a été montré que des mutations dans cette région provoquent un découplage ou un mauvais assemblage du transporteur. C'est le cas de la mutation R659N dans TAP1/2(ABCB2/ABCB3) qui donne lieu à un transporteur incapable de véhiculer des substrats même si celui-ci peut lier l'ATP et les peptides antigéniques [47, 261].

Autres Quelques transporteurs ABC présentent des domaines supplémentaires qui sont à l'origine de certaines particularités. Ainsi, les systèmes d'import bactériens nécessitent la présence de protéines accessoires, qui lient le substrat ("Substrat Binding Protein") assurant la spécificité et l'unidirectionnalité du transport.

Certains transporteurs appartenant à la sous-famille ABCC possèdent des domaines additionnels. C'est le cas de CFTR qui présente un domaine de régulation R

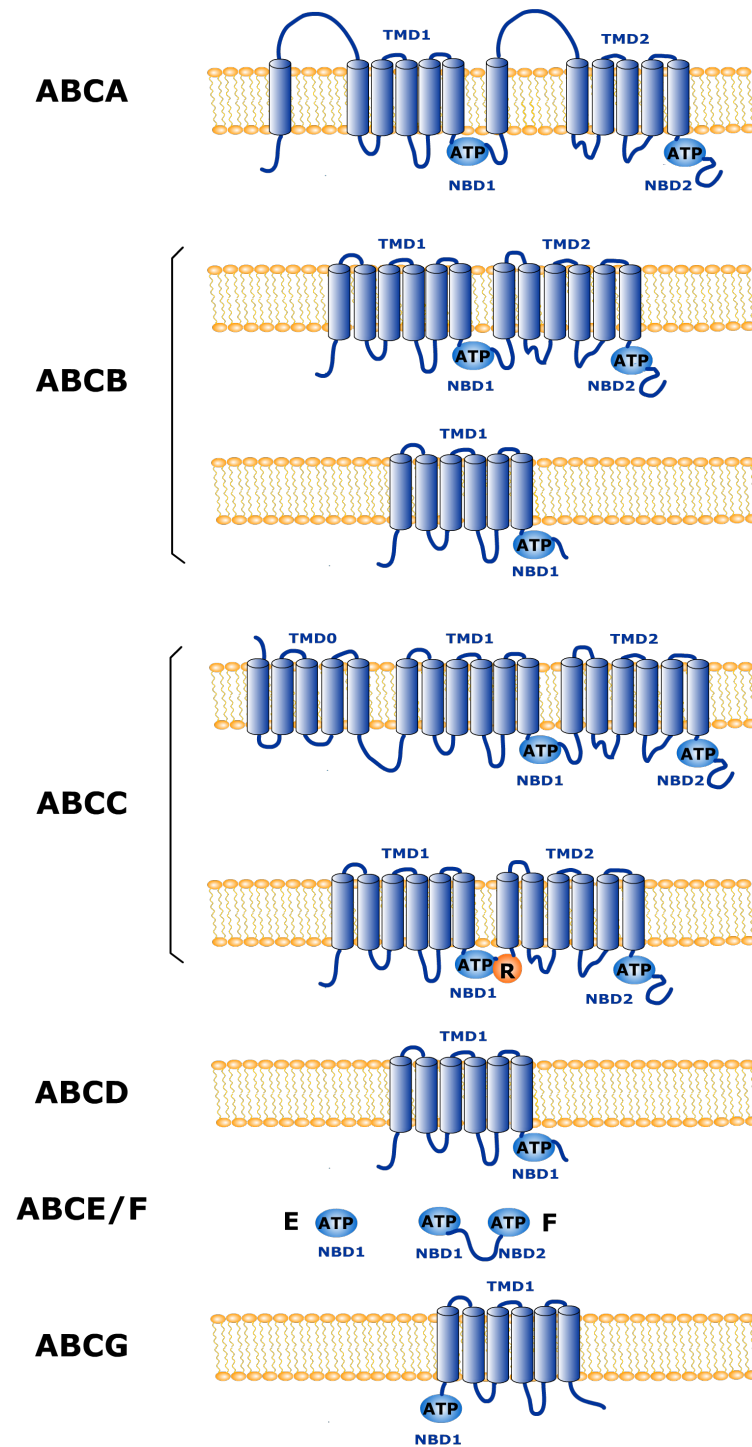


FIGURE 1.10 – Classification et topologie des transporteurs ABC.

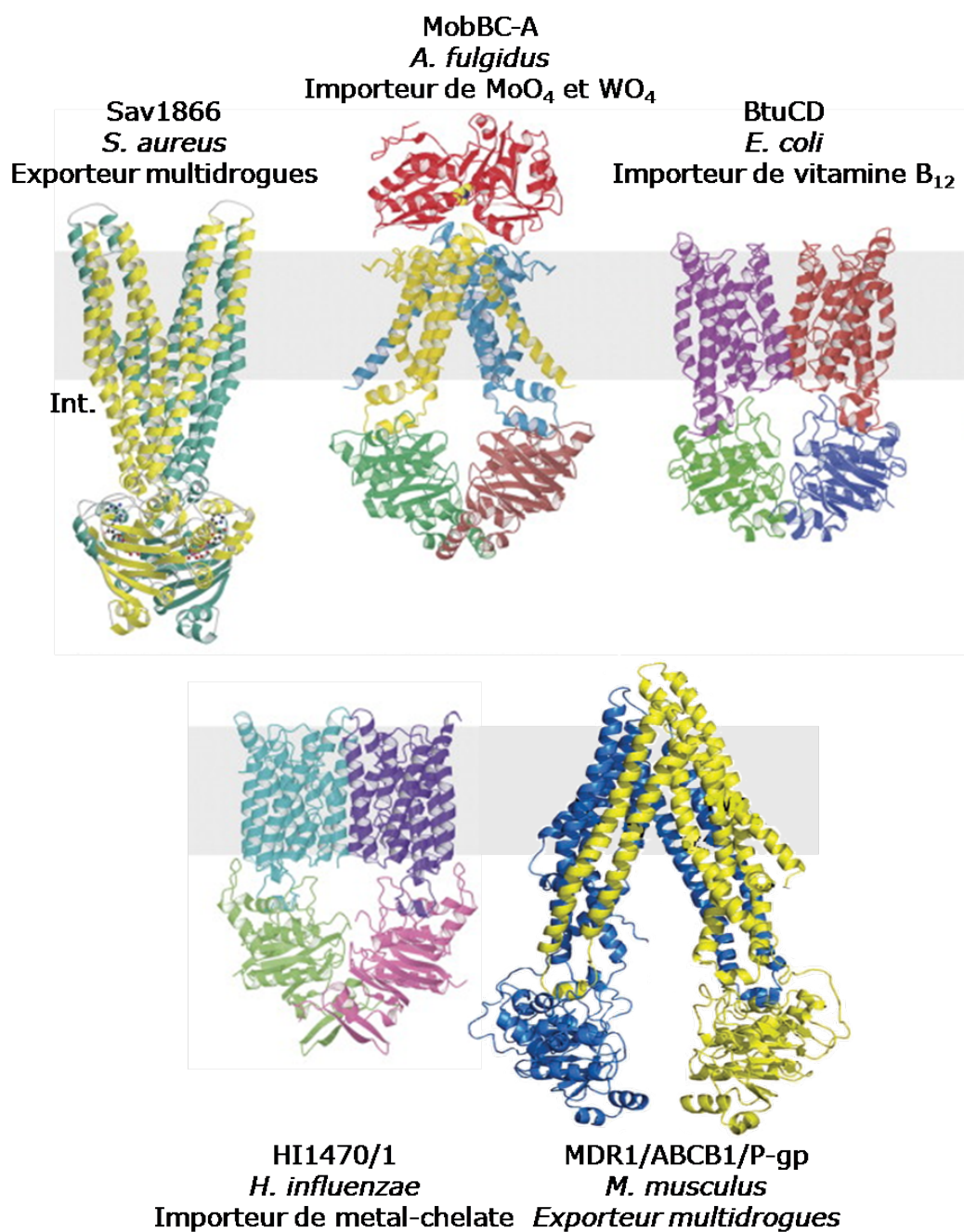


FIGURE 1.11 – Représentation en ruban de cinq structures de transporteurs ABC. Code PDB : Sav1866, 2HYD et 2ONJ ; MobBC-A, 2ONK ; BtuCD, 1L7V ; HI1470/71, 2NQ2 ; MDR1, 3G60, 3G61, 3G5U [123, 9].

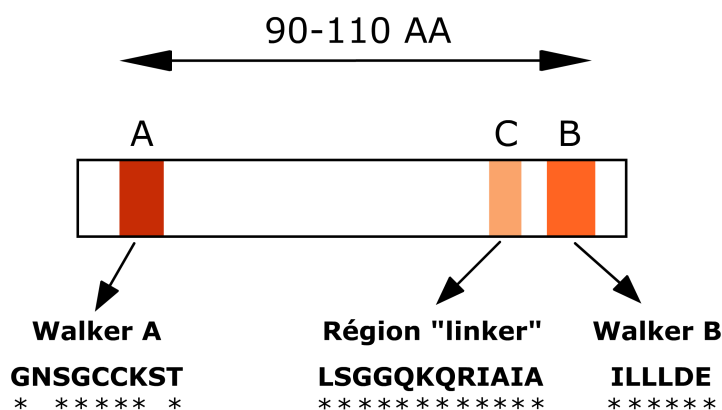


FIGURE 1.12 – Séquences consensus contenues dans les NBD. Les motifs A et B de Walker sont séparés par 90 à 110 résidus. La signature des transporteurs ABC, LSGGQ, précède le motif B de Walker. Les résidus soulignés par un astérisque sont ceux conservés dans la famille ABCB. D'après Gottesman *et al.*, 2001 [95].

ou encore de SUR1 et SUR2 qui ont un TMD supplémentaire en N-ter (fig. 1.10).

1.4.1.3 La fonction de transport

Les transporteurs ABC sont capables de véhiculer différents types de substrats : cholestérol, glycanes, protéines, peptides, sucres, toxines... Comme mentionné précédemment, la spécificité dépend de la composition de la partie transmembranaire. Les différentes structures de transporteurs ABC, et plus particulièrement celles de Sav1866 et ModBC-A ont permis d'établir un mécanisme de transport qui serait commun à tous les transporteurs. Il est à noter qu'avant la résolution de ces structures, des mécanismes avaient déjà été proposés [65, 118]. La structure de Sav1866 [66] se trouve être dans une conformation liée à l'ATP et orientée vers le milieu extracellulaire tandis que celle de ModBC-A [123] fait face au milieu cytoplasmique et ne présente aucune molécule d'ATP. En outre, ces deux protéines sont un exporteur et un importeur, respectivement. Malgré cette différence de fonction, la conservation de certains éléments (NBD, hélices de couplage) laisse à penser que ces deux transporteurs partageraient un mécanisme de transport commun. Celui-ci se déroulerait en quatre étapes (fig.1.13) :

- S'il s'agit d'un exporteur, le substrat se fixe.
- Dans les deux cas, la fixation d'ATP provoque le rapprochement des NBD et des hélices de couplage.
- La fixation de l'ATP s'accompagne d'un changement de conformation au niveau des TMD qui passent de la conformation ouverte vers le cytoplasme à celle faisant face au milieu extracellulaire. Il a été observé que la liaison d'ATP

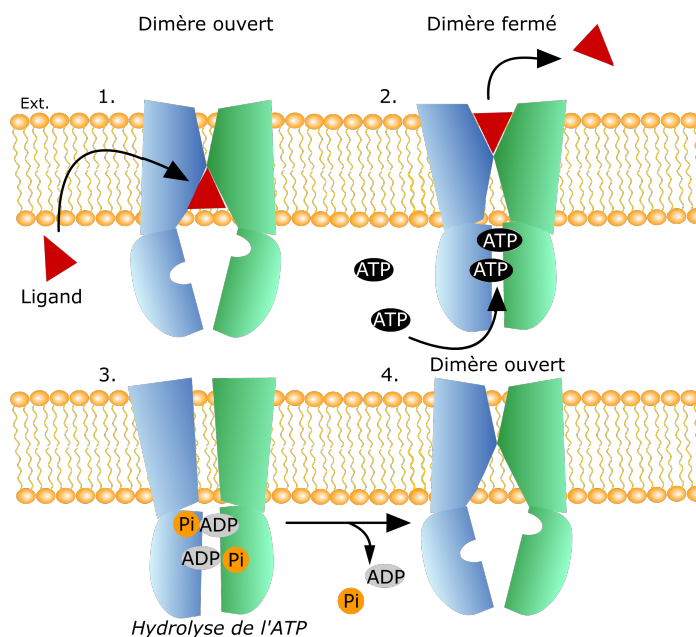


FIGURE 1.13 – Mécanisme de transport des protéines ABC. (1) Fixation du substrat. (2) Libération du substrat dans le milieu extracellulaire consécutive à un changement de conformation suite à la fixation d’ATP au niveau des NBD. (3) Hydrolyse de l’ATP. (4) Retour à la conformation initiale.

entraînait une modification de l’affinité du transporteur pour son substrat permettant ainsi sa libération [187]. Les importeurs peuvent alors interagir avec leurs protéines SBP pour lier le substrat et les exporteurs libèrent la molécule dans le milieu environnant.

- L’hydrolyse de l’ATP et, par conséquent, le relargage de l’ADP et du phosphate inorganique induisent un retour à la conformation de départ. Les importeurs laissent s’échapper leurs substrats tandis que les exporteurs peuvent fixer une nouvelle molécule à transporter [260].

1.4.2 Le récepteur des sulfonylurées

Le récepteur des sulfonylurées est un cas à part au sein de la famille des protéines ABC puisqu’il ne présente aucune fonction de transport. Il est cependant capable de réguler l’activité d’un canal ionique, Kir6.x.

1.4.2.1 Isoformes et localisation

SUR1 SUR1 comprend 1581 acides aminés et fut cloné à partir de cellules β pancréatiques de rat et de hamster [4]. On le trouve en majeure partie dans le pancréas,

en association avec Kir6.2 et dans une moindre mesure au niveau du cerveau associé aux deux isoformes de Kir6.x [132, 150, 174, 165].

SUR2 SUR2A et SUR2B comptent respectivement 1549 et 1591 résidus et sont obtenus par épissage alternatif du gène *abcc9*. Ce gène fut cloné à partir de banques génomiques de cœur et de cerveau de rat, en utilisant le gène de SUR1 de hamster comme sonde [130]. SUR2A est principalement exprimé dans le cœur et les muscles squelettiques [130, 134] et à plus faible échelle dans le cerveau et les îlots de Langerhans. SUR2B, quant à lui, est exprimé de manière ubiquitaire [134].

Les topologies prédites de SUR1, SUR2A et SUR2B sont très proches. Ils présentent une partie N-ter exposée au milieu extracellulaire et une région C-ter au niveau cytoplasmique. Ces récepteurs possèdent trois domaines transmembranaires : TMD0, TMD1 et TMD2 dans lesquels on dénombre, respectivement, cinq, six et six hélices transmembranaires. Ils possèdent deux domaines de liaison des nucléotides : NBD1 qui lie l'ATP et NBD2, l'ADP.

1.4.2.2 Acteurs de la régulation de SUR

Mg-nucléotides Afin d'accomplir son rôle de capteur métabolique, le canal K_{ATP} se doit d'être régulé par l'ADP intracellulaire [219]. En présence de Mg^{2+} , l'ADP active le canal avec une EC_{50} comprise entre 10 et 500 μM . Le MgADP, en se liant préférentiellement au NBD2 de SUR [316] stabiliserait une conformation post-hydrolytique de SUR, diminuant la sensibilité à l'ATP et facilitant l'ouverture du canal [346]. Pour que la régulation par l'ADP ait lieu, le Mg^{2+} doit être présent dans le milieu et les deux NBD ne doivent pas être altérés [97, 280]. En outre, SUR1 et SUR2B sont plus sensibles au MgADP que SUR2A [191], et ce pour deux raisons :

- L'activité catalytique du NBD2 de SUR1 est plus élevée que celle de SUR2A [188].
- La différence en C-ter qui existe entre SUR2A et SUR2B, due à l'épissage alternatif, confère à leur NBD2 des caractéristiques différentes [247].

D'autres Mg-nucléotides ont été répertoriés comme activateurs du canal K_{ATP} : Mg-ATP [99], Mg-GDP, Mg-GTP [309]...

Protéines G Suite à l'activation d'un GPCR, les protéines G hétérotrimériques se dissocient et peuvent réguler l'activité de certains canaux ioniques dont fait partie le canal K_{ATP} . Ainsi, il a été montré, en patch-clamp excisé, que la sous-unité α des protéines G pouvait activer les canaux K_{ATP} [307, 250]. Il s'est avéré que SUR est la cible des protéines G, $G\alpha_{i1}$ agissant positivement sur SUR1+Kir6.2 et dans une moindre mesure sur SUR2A+Kir6.2 [259]. En outre, $G\beta\gamma_2$ activent SUR1+Kir6.2 et SUR2A+Kir6.2 en diminuant leur sensibilité à l'ATP [321].

Zinc Le zinc, l'un des métaux lourds les plus présents dans l'organisme, agit comme un activateur extracellulaire du canal K_{ATP} constitué par SUR1+Kir6.2 [34]. Le site de liaison fait intervenir deux histidines (H326 et H332) de SUR1 qui sont absentes dans SUR2 [26]. De surcroît, sa capacité à activer SUR1+Kir6.2 et SUR2A+Kir6.2 du côté intracellulaire a été démontrée [239].

1.5 Un biocapteur naturel : Le canal K_{ATP}

1.5.1 Communication entre Kir6.x et SUR

Le canal K_{ATP} étant constitué de deux sous-unités, son bon fonctionnement nécessite une communication sans faille entre ses deux composants. Ainsi, la transmission des changements de conformation de SUR (induits par la fixation de ligands : nucléotides au niveau des NBD, activateurs au niveau de l'hélice 17 ou glibenclamide au niveau des boucles intracellulaires) à Kir6.x doit s'opérer, et ce, grâce à la présence de zones d'interaction entre les deux protéines (cf. section 1.2.2). Bien que différentes régions de contact/interaction entre SUR et Kir6.x ont été identifiées, le mécanisme de couplage comporte de nombreuses zones d'ombre.

TMD0-L0, région N-terminale de SUR1, a été montrée, par des expériences de co-immunoprécipitation, comme étant en contact avec Kir6.2 [81, 46, 20]. La coexpression de Kir Δ C avec TMD0 a mis en évidence le rôle de ce domaine dans la régulation de l'activité du canal. En effet, sa présence induit une augmentation de la P_o de Kir6.2 (de 0,1 à 0,6 environ) [20, 238]. Différents résidus ou régions de ce domaine ont été identifiés comme étant impliqués dans la régulation des propriétés biophysiques intrinsèques de Kir6.2. Un exemple est celui du résidu F132 (ICL2) dont la mutation en Leu, isolée chez un patient atteint du syndrome DEND ("Delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes"), a pour conséquence une augmentation de la P_o de Kir6.2 donnant indirectement lieu à une diminution de la sensibilité à l'ATP [238]. L'observation selon laquelle la probabilité d'ouverture des canaux formés par TMD0F132L+Kir6.2 est plus élevée que celle des canaux TMD0+Kir6.2 suggère que TMD0 aurait à la fois un effet activateur et inhibiteur sur Kir6.2. Ce dernier effet serait aboli par la mutation F132L. Un autre exemple, allant dans la même direction que le dernier, montre que la coexpression de Kir6.2 avec TMD0 lié à des fragments de L0 plus ou moins longs a des effets opposés sur la P_o [20]. En effet, l'allongement de la portion de la boucle L0 provoque, dans un premier temps une stabilisation de l'état ouvert du canal puis, à un certain point (Nt256), une baisse de la P_o est mesurée [20]. Ceci laisse à penser que cette région aurait deux effets opposés sur le "gating" de Kir6.2. De plus, l'étude d'une mutation en N-ter de Kir6.2 (28 Δ 32) trouvée chez un malade atteint de diabète néonatal a mis en évidence l'interaction entre ces cinq résidus N-terminaux et L0. Le fait que ce mutant soit moins sensible

à l'ATP repose sur l'incapacité de SUR1 à réguler négativement, via L0, l'activité de Kir6.2 [58].

Une autre région, riche en Asp et Glu (domaine ED), située entre NBD1 et TMD2 de SUR2A a été répertoriée comme étant impliquée, de manière allostérique, dans la transduction du changement de conformation entre SUR2A et Kir6.2 [148]. La suppression de ce domaine de quinze résidus entraîne la perte de la régulation de l'activité du canal par le MgADP, les ouvreurs et les bloqueurs. En outre, trois résidus (E1305, I1310, L1313), situés entre TMD2 et NBD2 de SUR2A, ont abouti à l'ébauche d'un mécanisme de transduction impliqué dans l'activation. En effet, la mutation de ces trois résidus en Ala abolit l'effet positif du MgADP et des ouvreurs sur Kir6.2 mais n'affecte pas l'inhibition provoquée par l'application d'ATP ou de glibenclamide. Ceci suggère que ces trois acides aminés interagiraient avec les régions cytoplasmiques de Kir6.2 uniquement dans le cas d'une activation [76].

Il a également été démontré que les régions C-ter et N-ter de Kir6.2 avaient une certaine importance dans la communication entre les deux sous-unités. Ainsi, des délétions N-terminales de Kir6.2 induisent une augmentation de la P_o uniquement en présence de SUR1 [21, 248]. Des mutations au niveau des résidus F35 et Q52, dans cette région, ont mené à la même observation [237, 302]. En outre, l'expression de SUR1, Kir6.2 et un peptide composé des 53 acides aminés N-terminaux de Kir6.2 provoque une augmentation de la probabilité d'ouverture due à une perte d'interaction entre les deux sous-unités [19]. Enfin, les mutations F333I et Y330C (C-ter de Kir6.2) affectent le couplage fonctionnel entre SUR1 et Kir6.2 [301].

1.5.2 Physiologie des canaux K_{ATP} à l'échelle de la cellule et de l'organe ; pathologies associées

De par leur capacité à être régulés par les nucléotides (rapport $\frac{[ATP]_i}{[ADP]_i}$), les canaux K_{ATP} constituent de véritables biocapteurs naturels, étant capables de déterminer l'état métabolique de la cellule et d'ajuster le potentiel membranaire en fonction. De cette manière, un niveau énergétique bas provoque l'ouverture des canaux tandis qu'un niveau énergétique élevé a pour conséquence leur fermeture. Lorsqu'ils sont activés, les canaux K_{ATP} entraînent, au repos, une hyperpolarisation, et, en cas d'activité, un raccourcissement des potentiels d'action. Inversement, leur inhibition a pour conséquence, au repos, une dépolarisation membranaire, et, en cas d'activité, une augmentation du taux de formation des potentiels d'actions.

1.5.2.1 Forme pancréatique

Rôle physiologique Il s'agit du rôle le plus étudié et le mieux caractérisé des canaux K_{ATP} . Ainsi, SUR1+Kir6.2, dans les cellules β pancréatiques, possède un

rôle prépondérant dans le phénomène de sécrétion d'insuline suite à un apport de glucose dans l'organisme. Lorsque la concentration en glucose est relativement faible, le rapport $\frac{[ATP]_i}{[ADP]_i}$ l'est aussi, ce qui sous-tend l'activation des canaux K_{ATP} . Le potentiel membranaire de repos est alors à un niveau hyperpolarisé. Suite à une augmentation de la glycémie, le glucose entre dans les cellules β pancréatiques via le transporteur Glut2. Il est alors métabolisé au niveau de la mitochondrie (cycle glycolytique) et conduit à la production d'ATP à partir d'ADP (fig.1.14). Le rapport $\frac{[ATP]_i}{[ADP]_i}$ augmente alors, l'ATP inhibant Kir6.2 et l'ADP stimulant SUR1, ce qui tend à diminuer l'activité des canaux K_{ATP} . Leur fermeture provoque une dépolarisation membranaire ce qui active des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de Ca^{2+} subséquente permet l'exocytose des granules d'insuline qui est libérée dans le sang assurant ainsi la régulation de la glycémie.

Les canaux K_{ATP} sont également présents dans les cellules α et δ pancréatiques mais l'étude de leur physiologie reste limitée du fait de la rareté de ces cellules. Dans les cellules δ , la sécrétion de somatostatine repose sur un mécanisme semblable à celui observé dans les cellules β [93]. Dans les cellules α , la sécrétion de glucagon fait appel à un mode opératoire différent. En effet, dans ce cas, une augmentation de la concentration en glucose est responsable de la baisse de la libération de glucagon. Cette différence de comportement s'expliquerait par l'intervention de canaux voltage-dépendants distincts de ceux des cellules β et δ [94].

Pathologies associées SUR1+Kir6.2 joue donc un rôle primordial dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Ainsi, lorsqu'il est sujet à dysfonctionnement, il devient le principal responsable de pathologies hyper- ou hypoinsulinémiques. De manière générale, des mutations touchant, soit Kir6.2, soit SUR1, peuvent être divisées en deux catégories :

- **Les mutations gain de fonction**, qui diminuent la sécrétion d'insuline et causent une hyperglycémie.
- **Les mutations perte de fonction**, qui ont pour conséquence l'augmentation de la sécrétion d'insuline et induisent une hypoglycémie.

A titre d'exemple, l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante (PHHI), qui se manifeste par une sécrétion d'insuline accrue et non régulée, est le plus souvent due à des mutations au niveau du gène de SUR1. Ces mutations peuvent être classées en deux catégories [13] :

- **Classe I** : mutations qui résultent d'un défaut d'adressage du canal.
- **Classe II** : mutations qui se caractérisent par une diminution de la probabilité d'ouverture due à une perte de la sensibilité au MgADP.

Dans certains cas (mutations de classe II), un traitement réalisé avec des ouvreurs tels que le diazoxide permet de restaurer l'activité du canal [13]. En outre, il a

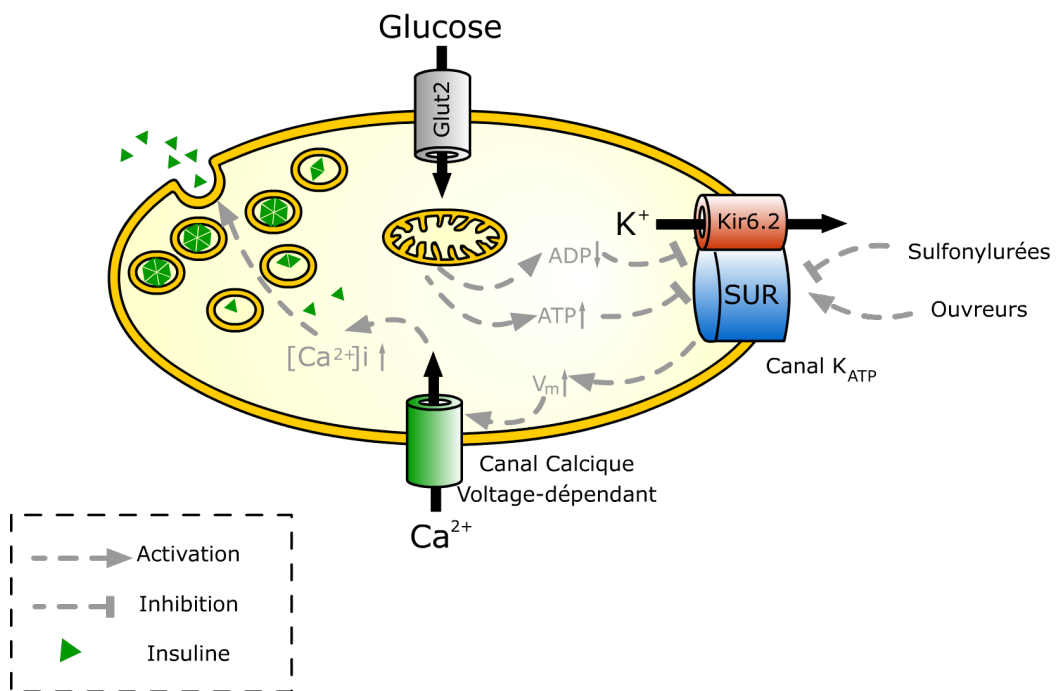


FIGURE 1.14 – Rôle des canaux K_{ATP} dans la sécrétion d'insuline. L'augmentation du taux de glucose sanguin provoque son entrée dans les cellules β pancréatiques. Sa dégradation via le cycle glycolytique augmente la concentration en ATP intracellulaire ce qui cause la fermeture des canaux K_{ATP} . La cellule est alors dépolarisée ce qui a pour conséquence l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de Ca^{2+} permet la libération des molécules d'insuline.

été montré *in vitro* que l'incubation avec des sulfonylurées aident les canaux mal repliés à atteindre la membrane plasmique [338]. Cette découverte représente une voie thérapeutique potentielle pour le traitement des pathologies résultant de mutations de classe II.

L'illustration d'une maladie résultant d'un gain de fonction du canal est le diabète néonatal. Dans ce cas, les canaux sont suractivés, ce qui induit une diminution de la sécrétion d'insuline. L'usage d'inhibiteurs (sulfonylurées) peut rétablir une activité quasi normale des canaux [158]. Les mutations à l'origine de cette pathologie se situent principalement à proximité du site de liaison de l'ATP de Kir6.2 et diminuent sa sensibilité à l'ATP [13]. Des mutations au niveau de SUR1, ayant un effet équivalent aux précédentes ont été recensées [24]. La gravité de cette maladie varie suivant la modification de sensibilité à l'ATP engendrée. Ainsi, la pathologie associée peut aller du diabète néonatal transitoire au diabète permanent accompagné de complications développementales ou encore neurologiques donnant lieu à des retards de développement et des épisodes épileptiques (syndrome DEND).

1.5.2.2 Le canal K_{ATP} dans le système nerveux central

Les canaux K_{ATP} sont exprimés dans différentes régions du cerveau [150]. Ainsi, on les trouve dans le cortex cérébral [179], l'hippocampe [101] ou encore au niveau de l'hypothalamus [195]. Il a été démontré que, au niveau de la substance grise, les neurones GABAergiques expriment exclusivement SUR1+Kir6.2 tandis que les neurones dopaminergiques expriment SUR1 et SUR2B avec Kir6.2 [174].

L'utilisation de souris transgéniques "knock-out" pour Kir6.2 a permis d'élucider le rôle des canaux K_{ATP} dans le cerveau, en cas d'hypoxie [335]. En conditions normales, les neurones GABAergiques des souris Kir6.2^{-/-} présentent une activité similaire à celle des souris "sauvages". Lorsqu'elles passent en conditions d'hypoxie, l'activité électrique des neurones des souris Kir6.2^{-/-} double quasiment tandis que celle des neurones de souris non-transgéniques diminue. En outre, les souris Kir6.2^{-/-} manifestent une sensibilité accrue à l'hypoxie puisqu'elles atteignent plus rapidement l'attaque cérébrale généralisée que les souris normales. Une autre expérience témoigne de l'implication des canaux K_{ATP} dans l'hypoxie au niveau de ces neurones : les souris SUR1^{-/-} ont une réponse similaire à celle des souris Kir6.2^{-/-} dans ces conditions [211]. Ainsi, lorsque l'oxygène vient à manquer dans ces régions du cerveau, cela induit une diminution du rapport $\frac{[ATP]_i}{[ADP]_i}$ qui a pour conséquence l'ouverture des canaux K_{ATP} et une hyperpolarisation de la cellule. Cette variation de potentiel de membrane entraîne une modification de l'activité des canaux cationiques voltage-dépendants qui induisent la dépolarisation cellulaire inactivant ainsi les neurones. Cela permet de limiter la propagation des attaques cérébrales en cas de stress métabolique (fig. 1.15).

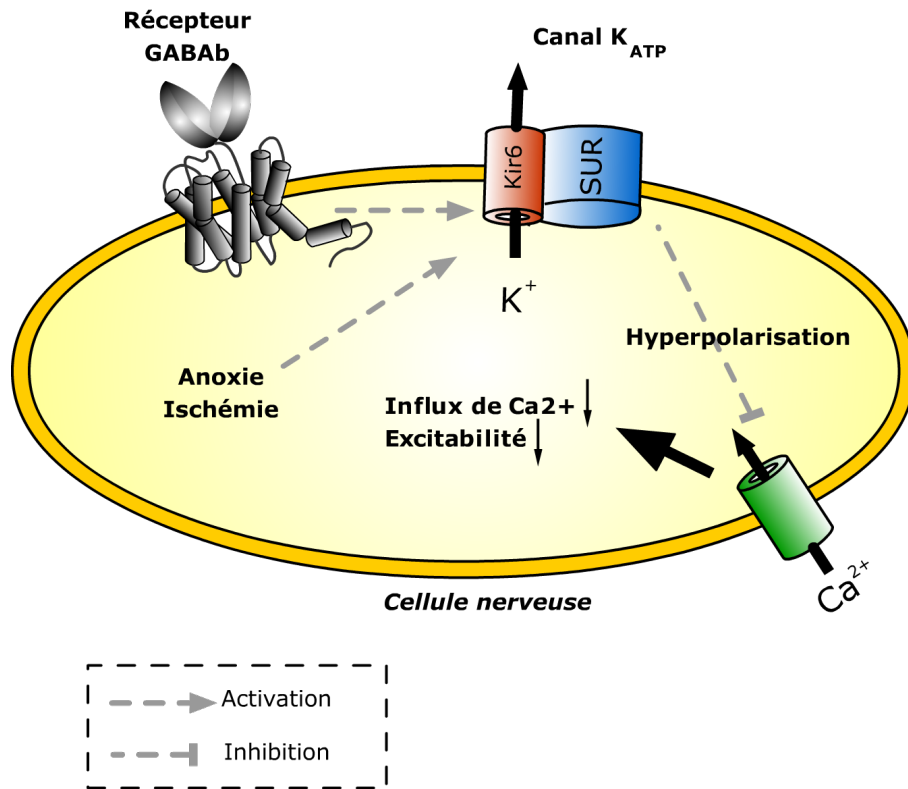


FIGURE 1.15 – Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule nerveuse. L'ouverture des canaux K_{ATP} neuronaux en réponse à une hypoxie empêche la propagation des attaques cérébrales.

L'hypothalamus est impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique, notamment du poids et de la glycémie, et les canaux K_{ATP} semblent, là encore, jouer un rôle dans cette fonction. Dans l'hypothalamus, il existe deux types de neurones qui sont régulés par le glucose : les neurones répondant au glucose ("glucose responsive", GR) et ceux sensibles au glucose ("glucose sensitive", GS). En cas de hausse de la glycémie, les neurones GR voient leur activité électrique augmenter tandis que celle des neurones GS diminue. Le fait que l'application de sulfonylurées sur les neurones GR entraîne leur dépolarisation a suggéré l'implication des canaux K_{ATP} [195]. En outre, il s'est avéré que les souris $Kir6.2^{-/-}$ présentaient un délai dans la réponse à l'hypoglycémie consécutive à la libération d'insuline à cause d'une sécrétion de glucagon altérée [299]. Néanmoins, la libération de glucagon par les cellules α du pancréas n'est pas affectée, confirmant ainsi un problème au niveau de l'hypothalamus. Les canaux K_{ATP} participent donc à la régulation hypothalamique de la sécrétion de glucagon.

1.5.2.3 Rôle du canal K_{ATP} dans le système cardiovasculaire

Les canaux K_{ATP} sont également présents dans le système cardiovasculaire. On les retrouve au niveau du myocarde, des muscles squelettiques et des muscles lisses. Contrairement aux canaux K_{ATP} pancréatiques, ces canaux sont fermés en conditions normales et s'ouvrent en cas de stress métabolique.

Muscle lisse Les canaux K_{ATP} des muscles lisses sont principalement constitués de sous-unités SUR2B et Kir6.1. En effet, la co-expression de ces deux sous-unités permet de reconstituer des canaux K_{ATP} possédant des propriétés similaires à celles des canaux natifs [241]. Ils contribuent à la régulation du tonus vasculaire et par conséquent à la modulation du flux sanguin. Leur régulation directe ou indirecte par différents composés est capable d'induire la dilatation ou la constriction des vaisseaux. Ainsi, la liaison d'adénosine [154], du peptide calcitonine "gene-related" (CGRP) ou encore celle de l'isoprenaline [327], sur leurs récepteurs respectifs, activent les canaux K_{ATP} , via la PKA, et provoquent une vasodilatation. Comme décrit en figure 1.16, les myocytes cardiaques ou les nerfs sensitifs, libèrent, en cas d'hypoxie, de l'adénosine ou du CGRP, respectivement. Leurs récepteurs étant couplés $G\alpha_s$, cela provoque une augmentation du taux d'AMPc, une activation de la PKA qui ouvre les canaux K_{ATP} . La cellule subit alors une hyperpolarisation qui a pour conséquence la fermeture de canaux calciques voltage-dépendants. La concentration en calcium intracellulaire diminue induisant la vasodilatation. A l'inverse, l'angiotensine II, la noradrénaline et l'histamine bloquent les canaux K_{ATP} de manière indirecte, via l'action de la PKC [111, 36]. Ceci a pour effet la constriction des vaisseaux.

De plus, la suppression des gènes de Kir6.1 ou SUR2B donne lieu à des vasospasmes et de l'hypertension [52, 196]. Il est possible, en activant les canaux K_{ATP} à l'aide d'ouvriers, de réguler le flux sanguin et de pallier une hypertension [137].

Muscle squelettique Les canaux K_{ATP} auraient un rôle prépondérant dans la protection du muscle squelettique contre la fatigue musculaire. En effet, un lien entre la fatigue et l'ouverture de ces canaux a été démontré [171]. Ainsi, l'application de glibenclamide conduit à une récupération de force moins efficace qu'en conditions normales, suggérant un rôle du canal dans la protection contre la fatigue musculaire. Le fait que l'ajout de pinacidil, un ouvreur du canal K_{ATP} , confère au muscle une meilleure résistance à la fatigue va dans le sens de cette hypothèse [189].

Au cours d'un effort musculaire, la diminution de la concentration locale en ATP et celle du pH (production d'acide lactique) provoquent l'ouverture des canaux K_{ATP} . L'augmentation de la conductance potassique raccourcit la durée des potentiels d'action (PA) et augmente la concentration extracellulaire en K^+ . La somme de ces deux

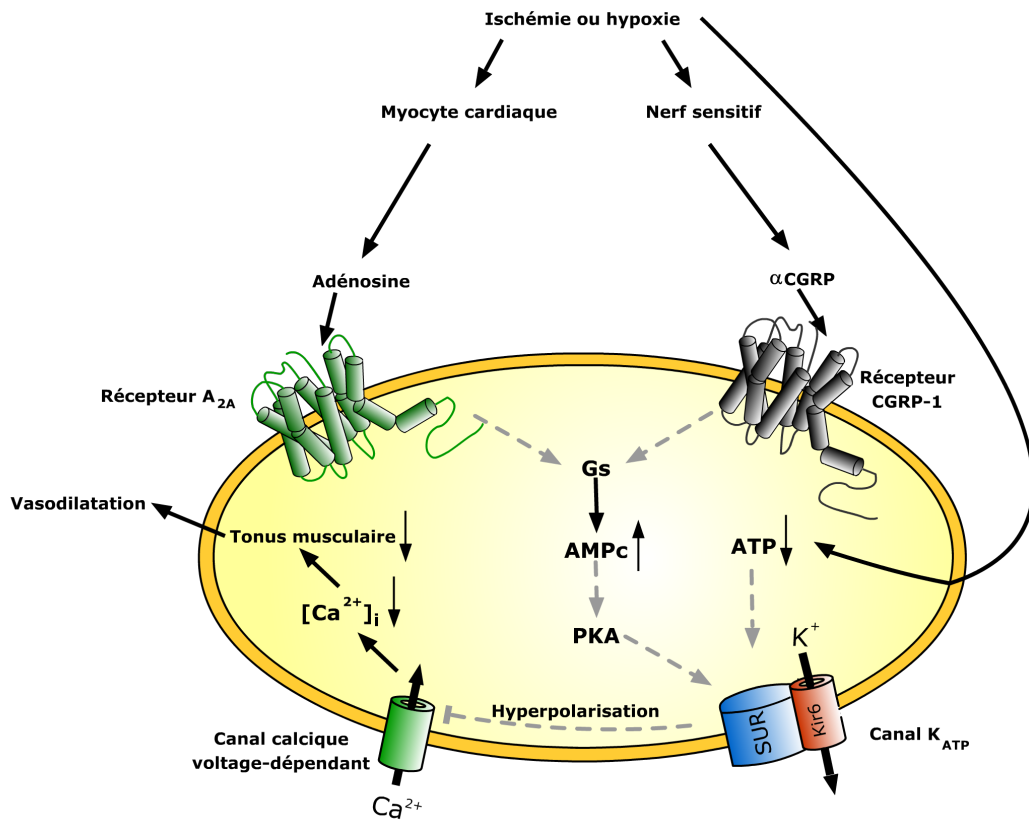


FIGURE 1.16 – Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire lisse. En cas d'hypoxie, les canaux K_{ATP} s'ouvrent sous l'action de la PKA et de la diminution de la concentration en ATP. L'hyperpolarisation qui suit bloque les canaux calciques voltage-dépendants, diminuant la concentration en calcium intracellulaire. Ceci a pour conséquence d'atténuer la contraction musculaire et provoque une vasodilatation.

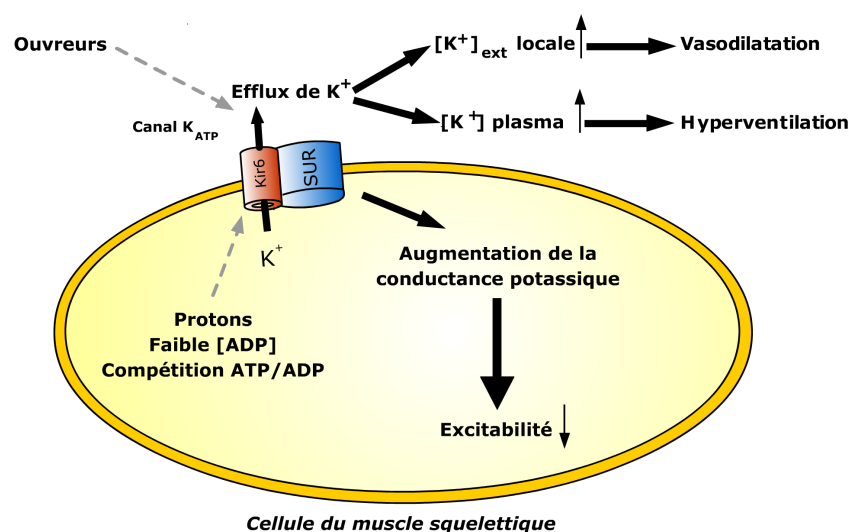


FIGURE 1.17 – Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire squelettique. Le travail musculaire entraîne l'ouverture du canal K_{ATP} , ce qui raccourcit la durée des PA, dépolarise la membrane et donne lieu à une baisse de l'excitabilité membranaire.

événements a pour effet une diminution de l'excitabilité membranaire, une baisse de la libération de calcium des compartiments intracellulaires et de la production de force (fig. 1.17). Ainsi, la consommation d'énergie de la cellule est moindre, ce qui la protège d'un appauvrissement énergétique.

Myocarde Les canaux K_{ATP} du myocarde sont principalement composés par les sous-unités SUR2A et Kir6.2. Leur présence permet de protéger le muscle cardiaque en cas de stress (ischémie). En effet, les canaux K_{ATP} s'ouvrent, raccourcissant ainsi la durée du potentiel d'action, diminuant l'influx de Ca^{2+} afin de réduire la consommation énergétique de la cellule (fig. 1.18) [217]. Cette fonction a été confirmée par l'étude de souris Kir6.2^{-/-} [297, 104].

De plus, il a été démontré que la fonction du canal K_{ATP} était altérée en cas d'arrêt cardiaque. L'utilisation d'un modèle de souris "arrêt cardiaque" (surexprimant le facteur de nécrose tumorale α) a mis en évidence une modification de la structure du myocyte cardiaque qui se répercute sur la capacité du canal K_{ATP} à être régulé par l'ATP [121]. Ceci serait dû à un défaut au niveau de la production d'énergie et de la transmission du signal énergétique dans un voisinage proche du canal. De cette manière, le canal K_{ATP} n'est plus capable d'assurer son rôle de maintien de l'homéostasie énergétique en réponse au stress [121].

Le canal K_{ATP} est également impliqué dans le phénomène d'adaptation au stress et plus particulièrement en conditions "flight or fight" qui correspond à la capacité d'un organisme à fuir ou à affronter une menace [274]. Dans ce cas, la demande

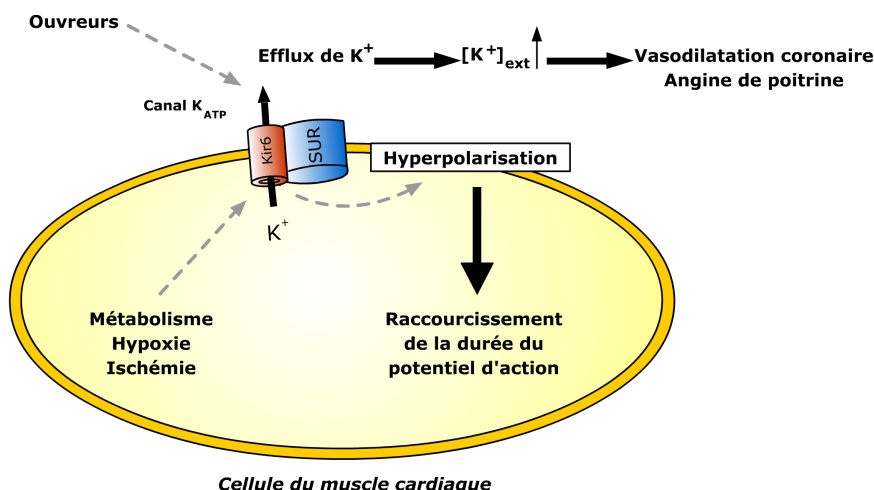


FIGURE 1.18 – Rôle des canaux K_{ATP} dans le myocarde. En cas de stress, L'ouverture des canaux K_{ATP} a pour effet le raccourcissement des PA, diminuant ainsi la contractibilité de la cellule et permettant le maintien de l'homéostasie énergétique de la cellule.

énergétique est importante et le canal K_{ATP} joue encore ici son rôle de modérateur, maintenant l'homéostasie afin d'éviter que la réponse au stress ne devienne elle-même dangereuse.

Des mutations du gène de SUR2A, au niveau du NBD2, ont été identifiées chez certains patients sujets à des attaques cardiaques, à de l'arythmie ventriculaire [33] ou encore à de la fibrillation atriale [227]. Ceci conforte donc le rôle du canal K_{ATP} dans la cardioprotection en cas d'ischémie.

1.5.3 Pharmacologie des canaux K_{ATP}

L'activité des canaux K_{ATP} peut être modulée de manière indépendante du métabolisme, grâce à l'utilisation de molécules synthétiques qui présentent des structures chimiques variées. Ces molécules peuvent être divisées en deux catégories : les ouvreurs potassiques (KCO) et les inhibiteurs appartenant en majeure partie à la famille des sulfonylurées.

1.5.3.1 Ouvreurs

Les ouvreurs des canaux K_{ATP} (KCO) constituent un groupe de composés relativement étendu, les différents membres ne présentant pas de pharmacophore (partie pharmacologiquement active d'une molécule) commun. Il se dégage cependant plusieurs groupements caractéristiques, qui permettent de les classer en familles. On retrouve donc parmi ces familles les benzothiazidines (diazoxide), les benzopyranes

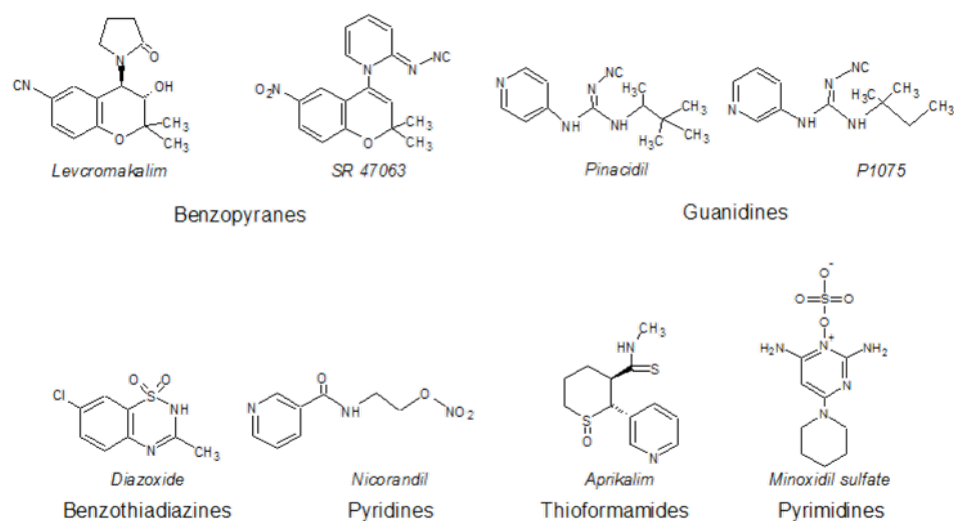


FIGURE 1.19 – Formules chimiques de quelques ouvreurs potassiques agissant sur le canal K_{ATP} .

(cromakalim), les cyanoguanidines (pinacidil), les thioformamides (aprikalim), les nicotinamides (nicorandil), les dérivés des pyrimidines (minoxidil), les dihydropyridines (ZM-244085), les cyclobutènediones (WAY-151616) ou encore les carbinols tertiaires (ZD-6169) (fig 1.19).

Le spectre d'action thérapeutique de ces ouvreurs est relativement étendu, allant des vasodilatateurs, aux anti-épileptiques, en passant par la stimulation de la croissance capillaire. Leur action requiert la présence des nucléotides. Ainsi, le MgATP est nécessaire à leur fixation et permet aux KCO d'exercer leur effet activateur [70, 18, 269].

La cible des KCO est la sous-unité régulatrice des canaux K_{ATP} , SUR [3, 197, 337]. Une grande proportion de ces ouvreurs vise SUR2A et SUR2B tandis que SUR1 est activé par un nombre limité de ces molécules [3, 62]. Cette différence de spécificité des ouvreurs représente un intérêt thérapeutique puisque cela permet d'obtenir des médicaments ciblant un tissu en particulier, réduisant ainsi les effets secondaires. De plus, cette propriété a permis de mettre en évidence certains sites d'action des ouvreurs : l'hélice transmembranaire 17 du domaine TMD2 de SUR2A héberge une thréonine (1253) et une leucine (1249) qui auraient un rôle dans le mode d'action des benzopyranes ou des guanidines [69, 204, 203]. En outre, la boucle intracellulaire reliant les hélices 13 et 14 (SUR2B) constitue également un site d'action des KCO.

Le diazoxide est un ouvreur non sélectif puisqu'il agit, en présence de MgADP, sur SUR1, SUR2B et SUR2A [69]. Son site de liaison serait situé au niveau du TMD1 [23, 62, 205].

1.5.3.2 Inhibiteurs

Les inhibiteurs des canaux K_{ATP} peuvent être divisés en deux classes : ceux agissant sur Kir6.2 et ceux interagissant avec SUR. Les imidazoles ciblent préférentiellement Kir6.2 [208, 236] et les sulfonylurées et les dérivés benzamides se lient à SUR avec une forte affinité (fig. 1.20) [15]. Néanmoins, il a été montré que les sulfonylurées pouvaient agir sur Kir6.2 mais avec une affinité moindre comparée à celle pour SUR ([98, 100].

Etant donné leur rôle inhibiteur des canaux K_{ATP} , ces molécules sont administrées en cas de diabète, puisqu'elles permettent de restaurer la sécrétion d'insuline assurant ainsi un retour à une glycémie normale. Ces propriétés hypoglycémiantes sont connues depuis plusieurs dizaines d'années [138]. De plus, l'administration de glibenclamide à des patients atteints du syndrome DEND pallie certains dysfonctionnements neurologiques (retard mental, motricité altérée) [198].

L'affinité d'un inhibiteur varie d'une isoforme de SUR à l'autre. Ainsi, des concentrations de tolbutamide de l'ordre du μM bloquent les canaux K_{ATP} comprenant SUR1 tandis qu'elles n'ont aucun effet sur ceux composés de SUR2A ou SUR2B [100] (tab. 1.2). Le meglitinide, un dérivé benzamido, quant à lui, présente une affinité semblable pour les trois types de canaux. Le rassemblement des différences structurales entre les classes de composés et les affinités mesurées apportent des informations quant à leur mode d'action. Ainsi, les sulfonylurées (*e.g.* tolbutamide) interagiraient avec un site de liaison spécifique sur SUR1 tandis que les dérivés benzamides (*e.g.* meglitinide), se lient à un site partagé par SUR1 et SUR2. Le glibenclamide est un composé hybride puisqu'il possède à la fois un groupement sulfonyl et un groupement benzamide. Il aurait donc deux sites de fixation sur SUR1 et un seul sur SUR2.

Les différences de sensibilité pour le tolbutamide, existant entre SUR1+Kir6.2 et SUR2+Kir6.2, ont été mises à contribution pour élucider le mode de fixation de ce composé. Pour cela, une approche chimérique a été mise en place, montrant que les hélices transmembranaires 14 à 16 de SUR1 sont nécessaires à l'action du tolbutamide, et plus précisément la Ser1237, localisée dans la boucle intracellulaire entre les hélices 15 et 16 [16, 22].

Le [3H]-glibenclamide, quant à lui, interagit avec les boucles intracellulaires se situant entre les hélices 5 et 6 (L0), d'une part, et entre les hélices 15 et 16, d'autre part [194]. La boucle comprise entre les hélices 15 et 16 constituerait le site de liaison du groupement sulfonylurée tandis que L0 abriterait le site dédié au groupement benzamide, et ce, en association avec le N-ter de Kir6.2 [22, 16, 194, 317].

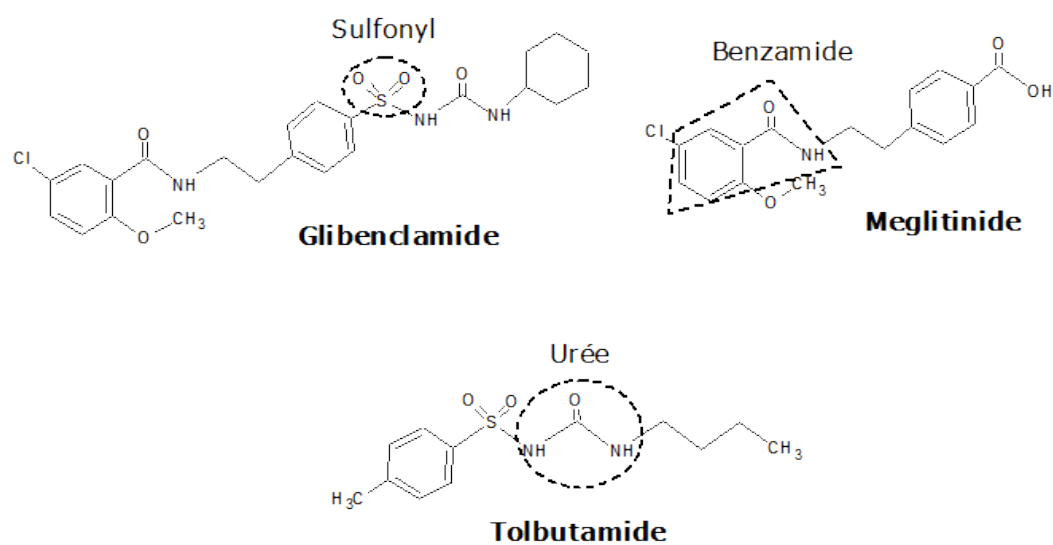


FIGURE 1.20 – Formules chimiques développées des inhibiteurs utilisés au laboratoire.

Canal K_{ATP}	Tolbutamide	Glibenclamide	Meglitinide
SUR1+Kir6.2	5 μ M	4 nM	0,3 μ M
SUR2A+Kir6.2	1,7 mM	27 nM	0,5 μ M

TABLE 1.2 – IC_{50} des inhibiteurs pour les canaux SUR1+Kir6.2 et SUR2A+Kir6.2. D'après Gribble *et al.*, 1998 [100].

Chapitre 2

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

2.1 Généralités

2.1.1 Caractéristiques générales des GPCR

2.1.1.1 Bref historique des GPCR

Au début du 19^{ème} siècle, de nombreux pharmacologues ont étudié les effets de neurotransmetteurs, hormones, médicaments naturels ou synthétiques sur des modèles animaux, des organes isolés ou des tissus. Ils étaient loin de réaliser que les effets observés résultaient en majeure partie de l'activité de la plus grande famille de récepteurs membranaires : les GPCR. C'est à cette époque qu'ont été établis de nombreux concepts tels que la notion de récepteur, de ligand, d'affinité ou encore d'efficacité. Bien avant le clonage des GPCR, dans les années 50, des molécules agissant sur ceux-ci étaient utilisées comme médicaments. Ce fut par exemple le cas du propranolol, un β -bloquant mis au point par Sir James Whyte Black à la fin des années 50.

Dans les années 60, Sutherland et Rall ont démontré, à partir de tissus isolés et de préparations cellulaires, que de l'AMP cyclique produit à partir d'ATP était le résultat de l'activité d'une enzyme, l'adénylyl cyclase [293, 294, 43]. La théorie de second messenger est ainsi née, suggérant que des stimuli extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs) étaient capables de réguler la production d'AMP cyclique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. L'AMP cyclique était alors considéré comme étant le médiateur entre les stimuli extracellulaires et le métabolisme, la croissance et la différenciation cellulaire. Cette découverte a ainsi permis de poser les premières pierres de la notion de voies de signalisation induites par les GPCR.

Au milieu des années 70, Henderson et Unwin mirent en évidence la structure

de la bacteriorhodopsine d'*Halobacterium halobium* par microscopie électronique et ce à une résolution de 7 Å [115]. Il était possible d'observer que cette protéine était composée de sept hélices transmembranaires. Par la suite, la bacteriorhodopsine fit office de référence pour modéliser la structure tertiaire des GPCR grâce à l'homologie de structure (et non de fonction) qu'elle présentait avec ceux-ci [305].

Une étape supplémentaire dans l'étude des GPCR est franchie en 1979, suite à la purification du récepteur β_2 adrénergique, issu d'érythrocytes de grenouille, par chromatographie d'affinité [44]. Pour effectuer cette purification Caron *et al.* ont utilisé de l'alprenolol (antagoniste du récepteur β_2 adrénergique) immobilisé sur une résine (Sephacrose-4B) de manière covalente. L'élution des récepteurs retenus sur la colonne a ensuite pu être réalisée en utilisant différents ligands. Ainsi, il leur a été possible, à l'aide d'un tampon contenant de l'isoproterenol (agoniste du récepteur β_2 adrénergique), de décrocher les récepteurs de la matrice.

Dans les années 80, commence l'ère du clonage des GPCR. Le premier récepteur à être cloné en 1982 fut la rhodopsine bovine [228] qui a ensuite servi de modèle pour l'étude des récepteurs membranaires jusqu'en 1986. En effet, au cours de cette année, des chercheurs de l'entreprise pharmaceutique Merck réalisèrent le clonage du récepteur β_2 adrénergique de hamster [71]. Cet événement représenta alors un tournant dans l'étude des GPCR puisque la comparaison des deux séquences permit de mettre en évidence l'homologie existant entre les deux récepteurs. L'idée de famille de récepteurs commença à émerger et prit tout son sens suite aux clonages d'autres GPCR tels que le récepteur muscarinique porcin [160] ou encore le récepteur dopaminergique D2 de rat [42] ... Des centaines de GPCR ont ensuite été clonés en utilisant des bibliothèques d'ADNc obtenues à partir de tissus ou cellules connus pour être riches en récepteurs. Ces bases ont été criblées dans le but de découvrir de nouveaux gènes candidats. Ainsi, de nombreux GPCR de fonction et ligands inconnus ont été identifiés et appelés récepteurs orphelins.

Les progrès plus récents (structures aux rayons X de GPCR, détermination de partenaires d'interaction ...) seront traités au cours des paragraphes suivants.

2.1.1.2 Topologie

Les GPCR sont des récepteurs membranaires polytopiques qui possèdent sept hélices α transmembranaires (fig. 2.1). Ces dernières sont constituées de 25 à 35 acides aminés présentant en majeure partie un caractère hydrophobe. Ces hélices sont arrangées dans le sens anti-horaire. Elles sont de plus reliées par trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2, ECL3), qui peuvent être impliquées, dans la fixation du ligand et par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2, ICL3) qui interagissent, entre autres, avec les protéines G hétérotrimériques. La partie N-terminale est plus ou moins étendue suivant la famille de GPCR et la longueur de l'extrémité C-terminale

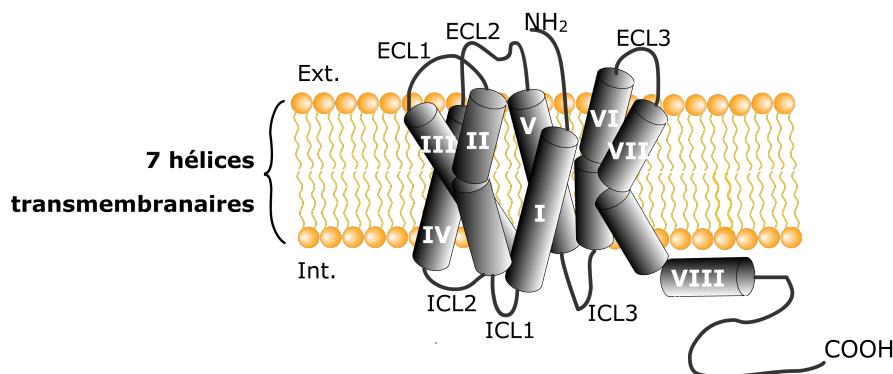


FIGURE 2.1 – Structure générale des GPCR.

varie d'un GPCR à l'autre.

2.1.1.3 Fonction

Les GPCR sont exprimés dans de nombreux tissus : cerveau, foie, rein, os, muscles... Par conséquent, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Ils peuvent être activés ou inhibés de manière spécifique par des molécules de diverses origines telles que des ligands endogènes (adrénaline, anandamide, chimiokines...), des médicaments (anti-histaminiques, β -bloquants...), des ligands provenant de l'environnement extérieur (photon, molécules odorantes...) (fig. 2.10). Ainsi, les GPCR ont pour mission d'assurer la transduction du signal, constituant le relais entre les milieux intra et extracellulaires.

2.1.1.4 Modèle d'activation des GPCR et activité constitutive

Il existe plusieurs modèles illustrant le mécanisme d'activation des GPCR.

Les ancêtres des modèles actuels Les premiers modèles utilisés pour illustrer le mécanisme d'activation des GPCR reposent sur la loi d'action de masse, considérant que l'interaction entre le récepteur (R) et l'agoniste (A) dépend de la constante d'association (K_A). Cette interaction engendre alors l'activation du récepteur. Cette vision s'est ensuite complexifiée en tenant compte de la notion de changement de conformation et des protéines G [152]. Un autre modèle, dérivant de celui de Monod, Wyman et Changeux [200], fait intervenir la notion d'allostérie appliquée aux GPCR [149].

Modèle ternaire/Modèle ternaire étendu En 1980, De Lean *et al.*, au cours d'une étude sur le récepteur β_2 adrénergique, établissent le modèle ternaire complexe

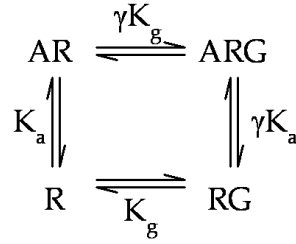


FIGURE 2.2 – Modèle du complexe ternaire. A : Agoniste, R : Récepteur, G : Protéine G.

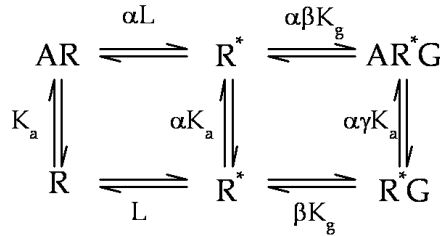


FIGURE 2.3 – Modèle ternaire étendu. A : Agoniste, R : Récepteur inactif, R* : Récepteur actif, G : Protéine G.

[67] (fig. 2.2). Ce modèle permet d'expliquer le comportement du récepteur suite à l'application de ligand. Il tient compte de l'interaction du récepteur avec les protéines G et de la différence d'affinité pour l'agoniste qui existe entre la forme liée aux protéines G et la forme libre.

Le modèle le plus largement reconnu est celui du complexe ternaire étendu (CTE, fig. 2.3), qui découle du précédent. Le CTE fut élaboré afin de répondre à l'observation selon laquelle un GPCR pouvait activer les protéines G sans être stimulé par un ligand [258, 167]. Il s'avère que la barrière d'énergie qui sépare l'état inactif (R) de l'état actif (R*) est peu élevée, ce qui permet à une faible proportion de récepteurs de passer de l'état R à R*. Dans ce modèle, l'agoniste présente une affinité plus forte pour R* que pour R, déplaçant ainsi l'équilibre vers la forme active du récepteur. Les antagonistes, quant à eux, ont une affinité semblable pour les deux formes et n'influencent pas l'équilibre. Les agonistes inverses ont une forte propension à se lier à R et déplacent donc l'équilibre vers la forme R.

Modèle ternaire cubique Il s'agit de la généralisation du modèle ternaire étendu [326]. Ce modèle tient compte du fait que les protéines G peuvent interagir avec un récepteur à l'état actif ou inactif (fig. 2.4). Dans ce modèle, le récepteur peut

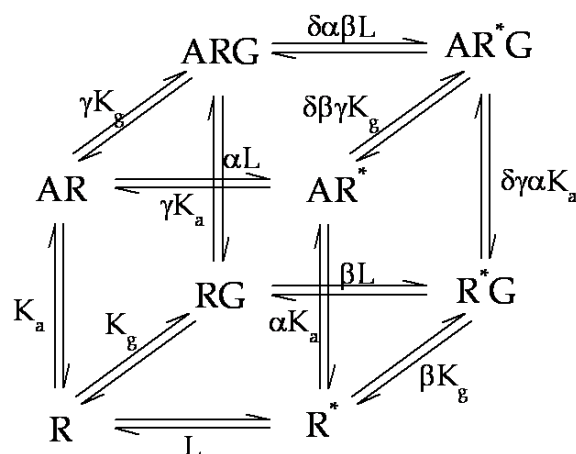


FIGURE 2.4 – Modèle ternaire cubique. A : Agoniste, R : Récepteur inactif, R* : Récepteur actif, G : Protéine G.

uniquement entrer en interaction avec une protéine G et/ou un ligand à la fois. De plus, différents récepteurs peuvent entrer en compétition pour un ligand ou une protéine G. Ainsi, plusieurs transformations permises ont été définies :

- Passage du récepteur de l'état actif à inactif.
- Liaison/dissociation des protéines G.
- Liaison/dissociation du ligand.

Les trois paires de faces du cube symbolisent ces transformations. De plus, il est possible d'ajouter un ligand, un sous-type de protéines G en assemblant plusieurs cubes. Ce modèle, pour le moins complexe, semble être le plus apte à décrire les observations empiriques obtenues avec certains GPCR.

Activité constitutive L'activité constitutive des GPCR peut être définie comme étant la capacité d'un récepteur à présenter une activité intrinsèque, en absence d'agoniste. Les premières preuves d'activité constitutive des GPCR ont été obtenues d'une part, avec le récepteur opioïde δ [157], et, d'autre part à partir d'une étude sur le récepteur β_2 adrénergique purifié [45]. Cette dernière a été la cible de certaines controverses car la présence de thiols dans le milieu réactionnel a, par la suite, été démontrée comme étant responsable de l'activité basale alors observée [232]. Une étude réalisée, par Costa *et al.*, sur des neuroblastomes présentant un fort taux d'expression du récepteur opioïde δ a permis de mettre en évidence l'existence de deux types d'antagonistes : ceux pouvant inhiber l'activité GTPase de la sous-unité α mesurée en absence de ligand et ceux ne présentant aucun effet [55]. Des mutants provoquant l'augmentation de l'activité constitutive des GPCR furent ensuite découverts

[56, 258, 249].

D'un point de vue physiologique, l'activité constitutive aurait une certaine importance dans le cas de récepteurs impliqués dans des phénomènes d'équilibre énergétique et de régulation de l'appétit. En outre, il a été montré que certaines mutations augmentant cette activité peuvent être à l'origine de certaines pathologies : cécité nocturne, hyperthyroïdie, carcinomes...

2.1.1.5 Les ligands

Le tableau 2.1 rassemble les principales caractéristiques des différents types de ligands pouvant interagir avec les GPCR. La figure 2.5 représente l'effet sur l'activité du récepteur induit par chaque type de ligand, et ce, en fonction de la concentration. Cette activité peut être mesurée de manière directe (au niveau des protéines G) ou indirecte (mesure du taux d'AMPc, de calcium intracellulaire...).

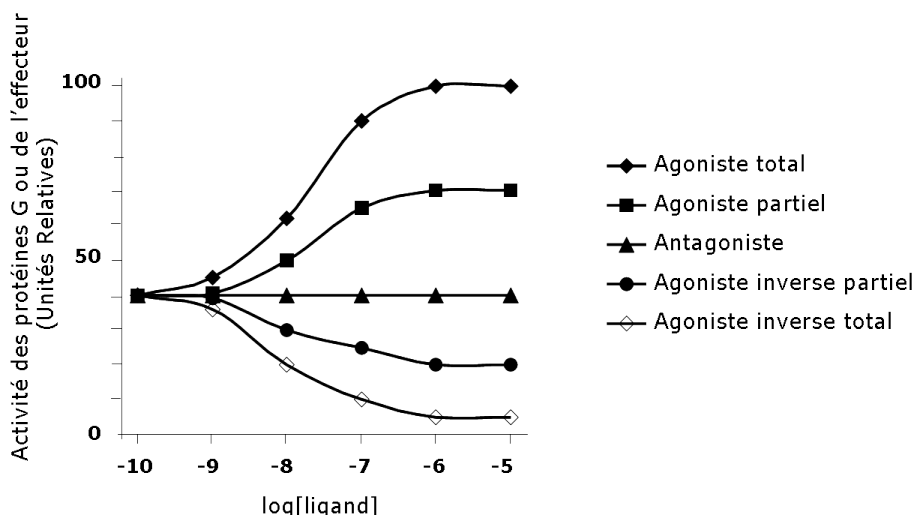


FIGURE 2.5 – Courbes doses-réponse représentatives des différents types de ligands.

2.1.2 Classification

Les GPCR appartenant à une même famille partagent au moins 25% d'identité de séquence au niveau de la région transmembranaire et possèdent un ensemble de résidus et de motifs hautement conservés. Il existe plusieurs types de classification des GPCR reposant sur différents critères tels que le mode de fixation du ligand et/ou la structure (familles 1–5) [35] ou sur des analyses phylogénétiques [86]. La classification A–F, décrite pour la première fois en 1994 [17, 156], reste la classification la plus utilisée. Elle prend en compte les GPCR exprimés chez les vertébrés et les invertébrés. Un autre système est disponible depuis le début des années 2000. Il s'agit de la

Ligand	Caractéristique
Agoniste total	Se lie au récepteur et modifie son état (R^*) dans le but d'induire une réponse biologique. Entraîne une activation maximale du récepteur
Agoniste partiel	Provoque une activation inférieure à celle induite par les agonistes totaux. La notion d'agoniste partiel et total peut cependant varier d'un système à l'autre (type de cellules, système de mesure. . .)
Agoniste inverse	Inhibe l'activité constitutive des récepteurs
Antagoniste	Diminue ou empêche l'action d'un agoniste

TABLE 2.1 – Les différents types de ligands interagissant avec les GPCR.

classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin) qui a été construite suivant des critères phylogénétiques, à partir d'une analyse du génome humain [86].

2.1.2.1 Classe A/Rhodopsin/Famille 1

La classe A ou "rhodopsin-like" est la plus étendue des cinq familles. Elle comprend l'opsine, les récepteurs olfactifs, les GPCR activés par les petites molécules (catécholamines. . .), par les peptides (hormones. . .) ou encore par les hormones glycoprotéiques. Cette famille est caractérisée par la présence d'acides aminés très conservés au niveau de la partie transmembranaire. En général, un pont disulfure est présent entre les boucles ECL1 et ECL2 et ils possèdent une cystéine palmytoylée en C-ter. Pour les petites molécules, le site de liaison du ligand est situé au sein de la partie transmembranaire tandis que dans le cas des peptides et des glycoprotéines, il se trouve au niveau de la partie N-terminale et des boucles extracellulaires (fig.2.6).

2.1.2.2 Classe B/Secretin/Famille 2

Elle contient environ 50 membres qui sont activés par, entre autres, la sécrétine, le glucagon, la calcitonine, l'hormone parathyroïde. . . La plupart des GPCR appartenant à cette famille est couplée aux protéines G_{α_s} . De plus, ces récepteurs présentent une extrémité N-terminale particulièrement étendue qui est impliquée, en association avec certaines boucles extracellulaires, dans la fixation du ligand. Cette même partie N-ter contient trois ponts disulfure conservés. Dans la classification A-F, les récepteurs d'adhésion sont considérés comme appartenant à la classe B.

2.1.2.3 Classe C/Glutamate/Famille 3

La classe C, ou classe des récepteurs glutamate, possède 17 représentants dans le génome humain. Elle compte parmi ses membres le récepteur métabotrope du glutamate (mGluR), le récepteur de l'acide γ -aminobutyrique de type B (GABA_B), le récepteur du calcium (CaR) et quelques récepteurs gustatifs. La majorité de ces GPCR présente des régions N-ter et C-ter très étendues, un pont disulfure reliant les boucles ECL1 et ECL2 ainsi qu'une boucle ICL3 particulièrement courte. La région de fixation du ligand se situe dans la partie N-ter et forme le module "Venus Fly-Trap" (VFTM). Ce module est relié au reste du récepteur par un lien contenant neuf cystéines. Suite à la fixation du ligand, le VFTM subit des changements conformationnels importants qui entraînent la formation d'homodimères [234].

2.1.2.4 Adhesion

Les récepteurs appartenant à cette classe sont aussi appelés GPCR d'adhésion. Sur 33 membres, seuls 3 ne sont plus orphelins. Les ligands sont bien souvent des peptides ou des glycosaminoglycanes. De plus, ils présentent des similarités de séquence avec la classe B au niveau de la partie transmembranaire. Leur extrémité N-ter est très grande et possède un domaine protéolytique ("GPS domain"). Ce dernier sert de site de clivage qui a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, dans un compartiment au début du Golgi, et est nécessaire au transport et à l'adressage membranaire du récepteur [159].

2.1.2.5 Récepteurs frizzled/Taste2

Récepteurs Frizzled/Smoothened/Famille 5 Cette famille de GPCR n'a été identifiée que très récemment. Il existe 10 récepteurs Frizzled et 1 Smoothened. Ce type de récepteur a tout d'abord été découvert chez la drosophile [318] et 10 homologues ont ensuite été mis en évidence chez l'Homme [343]. La partie extracellulaire est composée de 200 à 300 acides aminés et contient le domaine de liaison du ligand, la glycoprotéine Wnt. Ces récepteurs sont impliqués dans le développement. Le récepteur Smoothened (Smo), quant à lui, ne posséderait pas de ligand et serait régulé par le récepteur "Patched" [49]. Il aurait un rôle dans la formation et l'homéostasie de certains tissus et organes.

Récepteur Taste2 Cette famille contient 25 récepteurs dans le génome humain. Un grand nombre de ces GPCR est orphelin. Leur longueur est comprise entre 290 et 340 acides aminés et ils possèdent des extrémités N-ter et C-ter courtes. ECL1 et ECL2 ne sont pas reliées par un pont disulfure et les boucles extracellulaires ont un rôle important dans la reconnaissance du ligand. Ces récepteurs sont exprimés

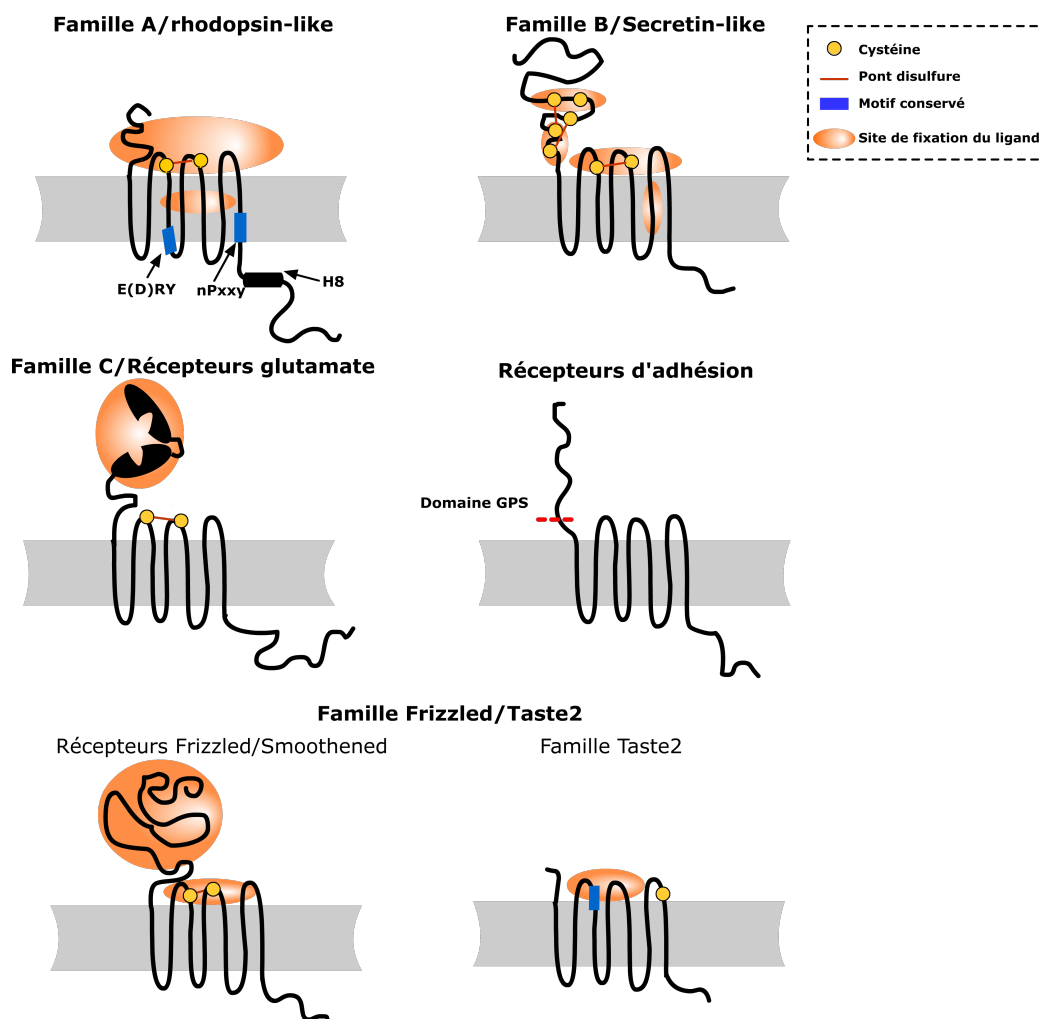


FIGURE 2.6 – Classification GRAFS des GPCR.

dans la langue et les cellules épithéliales du palais et seraient impliqués dans la reconnaissance du goût amer.

2.1.2.6 Autres familles de GPCR

Les familles D et E ne sont pas représentées dans la classification GRAFS car celles-ci ne sont pas exprimées chez l'Homme. La classe D regroupe les récepteurs des phéromones de levure. Les récepteurs de l'AMPc sont au nombre de quatre et constituent la classe E. Ils ont uniquement été observés chez *Dictyostelium discoideum* [246, 153].

2.1.3 Structures connues de GPCR eucaryotes

A partir de l'an 2000, une seule structure de GPCR est disponible, celle de la rhodopsine à l'état inactif [230]. Ces trois dernières années ont vu fleurir plusieurs structures de GPCR : celles des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, du récepteur de l'adénosine A_{2A} ainsi que celles de l'opsine/rhodopsine dans différentes conformations.

2.1.3.1 Un GPCR dans tous ses états : la rhodopsine

La toute première structure de rhodopsine a été résolue en l'an 2000 [230]. Il s'agit de la rhodopsine à l'état inactif, en présence du 11-cis rétinale qui joue ici le rôle d'agoniste inverse (bloque l'activité constitutive du GPCR). Ces données ont permis de mettre en évidence certaines caractéristiques des GPCR appartenant à la famille A, c'est-à-dire :

- Sept hélices transmembranaires.
- Un pont disulfure reliant les boucles ECL1 et ECL2.

De surcroît, cette structure a fait la lumière sur l'existence de résidus pouvant transmettre les changements conformationnels entre les parties transmembranaires et cytoplasmiques suite à la photoactivation. Elle a également confirmé l'emplacement du chromophore (le 11-cis rétinale) qui se situe au sein de la partie transmembranaire.

Huit ans plus tard, la structure de l'opsine est élucidée [231]. L'opsine correspond à la forme active de la rhodopsine. En effet, lorsque cette dernière est activée par un photon, il se produit l'isomérisation du 11-cis rétinale en all-trans rétinale qui est ensuite hydrolysé et évacué de son site de liaison. Cette structure a été obtenue à une résolution de 2,8 Å. Elle a abouti à l'identification de certaines régions subissant un changement de conformation entre l'état actif et inactif (Motif E(D)RY, NPxxY(x)_{5,6}F, hélices TM5–7). Grâce à ces nouveaux éléments, il a été possible de décrire les réarrangements conformationnels nécessaires à l'entrée et la sortie du rétinale. Ainsi, contrairement à la rhodopsine, deux sites, un d'entrée et un de sortie sont disponibles pour le rétinale dans l'opsine. Le premier se situe entre l'hélice V et l'hélice VI et le second entre la I et la VII.

Il est à noter qu'une troisième structure de l'opsine a été déterminée en présence d'un peptide de onze acides aminés mimant la transducine (partie C-terminale de la sous-unité α) ceci permettant de stabiliser l'opsine [262]. Les caractéristiques de cette structure sont assez proches de celles de l'opsine seule, on retrouve les deux sites d'accès au rétinale entre les hélices V/VI et I/VII. Les extrémités des hélices V et VI sont rapprochées et presque parallèles. Deux résidus, l'Arg135 et la Tyr233, interagissent avec la Cys 347 qui se trouve en C-ter de la sous-unité $G\alpha$. En outre, certains résidus appartenant aux motifs conservés E(D)RY et NPxxY(x)_{5,6}F sont

essentiels à la formation des interactions avec la protéine $G\alpha$.

2.1.3.2 Les récepteurs β adrénergiques

Le récepteur β_2 adrénergique Deux structures, obtenues par deux approches différentes, ont été publiées successivement à la fin de l'année 2007. La première repose sur une stratégie faisant intervenir une protéine de fusion [50]. Elle fut obtenue en remplaçant la boucle i3 par le lysozyme T4 afin d'augmenter les surfaces d'interaction et ainsi faciliter sa cristallisation. Ceci a abouti à une structure haute résolution du récepteur β_2 adrénergique à 2,4 Å.

La seconde fut déterminée en faisant interagir le récepteur avec un fragment de FAb reconnaissant un épitope situé dans la partie extracellulaire du récepteur. La résolution de cette structure est de 3,5 Å.

Une troisième structure est parue en 2008 reposant sur une forme stabilisée du récepteur humain (mutant E122W [254]) en interaction avec le timolol, un agoniste inverse [109]. Grâce à ces données, il a été possible de mettre en évidence la présence de sites de fixation spécifiques pour le cholestérol entre les hélices II, III et IV.

Le récepteur β_1 adrénergique La structure du récepteur β_1 adrénergique de dinde a été résolue en présence d'un antagoniste, le cyanopindolol [325]. La principale différence entre le récepteur β_2 adrénergique et le β_1 réside dans la présence d'une courte hélice dans la boucle ICL2.

2.1.3.3 Le récepteur adénosine A_{2A}

La structure du récepteur A_{2A} , à 2,8 Å, a été déterminée en 2008, et ce, en complexe avec un antagoniste, le ZM-241385 [135]. La stratégie utilisée est la même que celle ayant servi pour la première structure du récepteur β_2 adrénergique. Le récepteur A_{2A} a en effet été fusionné avec le lysozyme T4 et a été tronqué en C-ter. La comparaison entre les différentes structures de GPCR montre que le récepteur A_{2A} , contrairement aux autres (rhodopsine, β_2 , β_1) ne présente pas de structure secondaire au niveau de la boucle ECL2. De plus, le récepteur possède trois ponts disulfure entre ECL1 et ECL2 et un quatrième au sein de la boucle ECL3 qui joue un rôle dans l'exposition au solvant du site de liaison.

2.2 Voies de signalisation

2.2.1 Les protéines G

Les protéines G hétérotrimériques constituent un des principaux modes de transduction du signal des GPCR. Elles sont constituées de trois sous-unités : la sous-

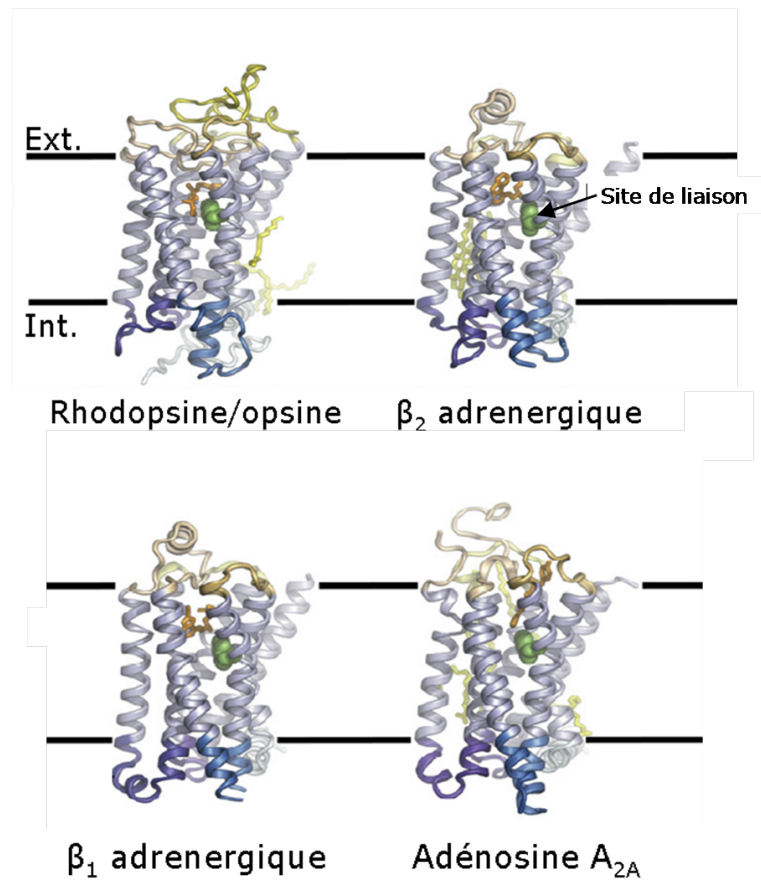


FIGURE 2.7 – Structures connues de GPCR [110]. Les régions transmembranaires sont représentées en bleu clair, les régions intracellulaires en bleu foncé, les lipides en jaune, les régions extracellulaires en marron et les ligands en orange.

unité α , qui possède un domaine GTPase, la sous-unité β et la sous-unité γ .

Lorsqu'un GPCR est activé par un ligand, un changement de conformation se produit au niveau de la sous-unité α qui engendre un échange de GDP par GTP (fig. 2.8). Cela aboutit à la dissociation de la sous-unité α des sous-unités $\beta\gamma$. Chaque protéine est alors capable d'activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires ou membranaires. Suivant le type d'effecteur, différentes réponses sont induites à l'échelle de la cellule. Par la suite, la sous-unité α lie un GTP qu'elle hydrolyse grâce à son activité GTPase permettant ainsi la réassociation avec $\beta\gamma$ et un retour à l'état 1. Il est supposé qu'un seul GPCR est capable d'activer plusieurs protéines G apportant de cette manière une amplification du signal. De plus, une grande quantité de messagers secondaires (AMPc, IP₃...) est produite par les effecteurs amplifiant d'autant plus le phénomène.

La spécificité des réponses ainsi engendrées, suivant le GPCR activé, découle en partie de la diversité des protéines G, tant au niveau de la sous-unité α qu'au niveau de β ou γ .

Certaines protéines peuvent interférer avec le cycle des protéines G. Il s'agit des protéines RGS (Regulators of G protein Signaling) et AGS (Activators of G protein Signaling) qui régulent l'activation des protéines G hétérotrimériques (fig. 2.8). Les protéines RGS ont pour propriété d'augmenter l'activité GTPase des sous-unités $G\alpha_i$ et/ou $G\alpha_q$. Ceci a pour conséquence d'abolir toute voie de signalisation résultant de l'activation de la sous-unité α . Les protéines AGS jouent différents rôles suivant la classe à laquelle elles appartiennent :

- Groupe I : la protéine identifiée faisant partie de ce groupe est AGS1 et facilite l'échange GDP/GTP en se liant à α . Ceci permet d'activer les voies de signalisation déclenchées par cette sous-unité.
- Groupe II : Ces protéines stabilisent l'état α -GDP et semblent augmenter le taux de $\beta\gamma$ libres dans le cytoplasme.
- Groupe III : Ce groupe est connu pour se lier aux sous-unités $\beta\gamma$.

2.2.1.1 La sous-unité α

Il existe 21 sous-types de sous-unités $G\alpha$ qui sont codés par 16 gènes différents (tab. 2.2). Leurs masses moléculaires varient de 39 à 46 kDa environ. Cette sous-unité est composée d'un domaine GTPase et un domaine hélicoïdal (fig. 2.9) [163]. Les six hélices de ce domaine recouvrent, à la façon d'un couvercle, la poche de liaison des nucléotides. Toutes les sous-unités α , à l'exception de $G\alpha_t$, sont palmytoylées en N-ter au niveau d'une cystéine (modification réversible). En outre, les protéines $G\alpha_i$ sont myristoylées (modification irréversible) en N-ter. Ces propriétés permettent la régulation de la localisation intracellulaire et également de l'interaction protéine-protéine [284]. Il existe quatre types de protéines $G\alpha$ (tab.2.2) :

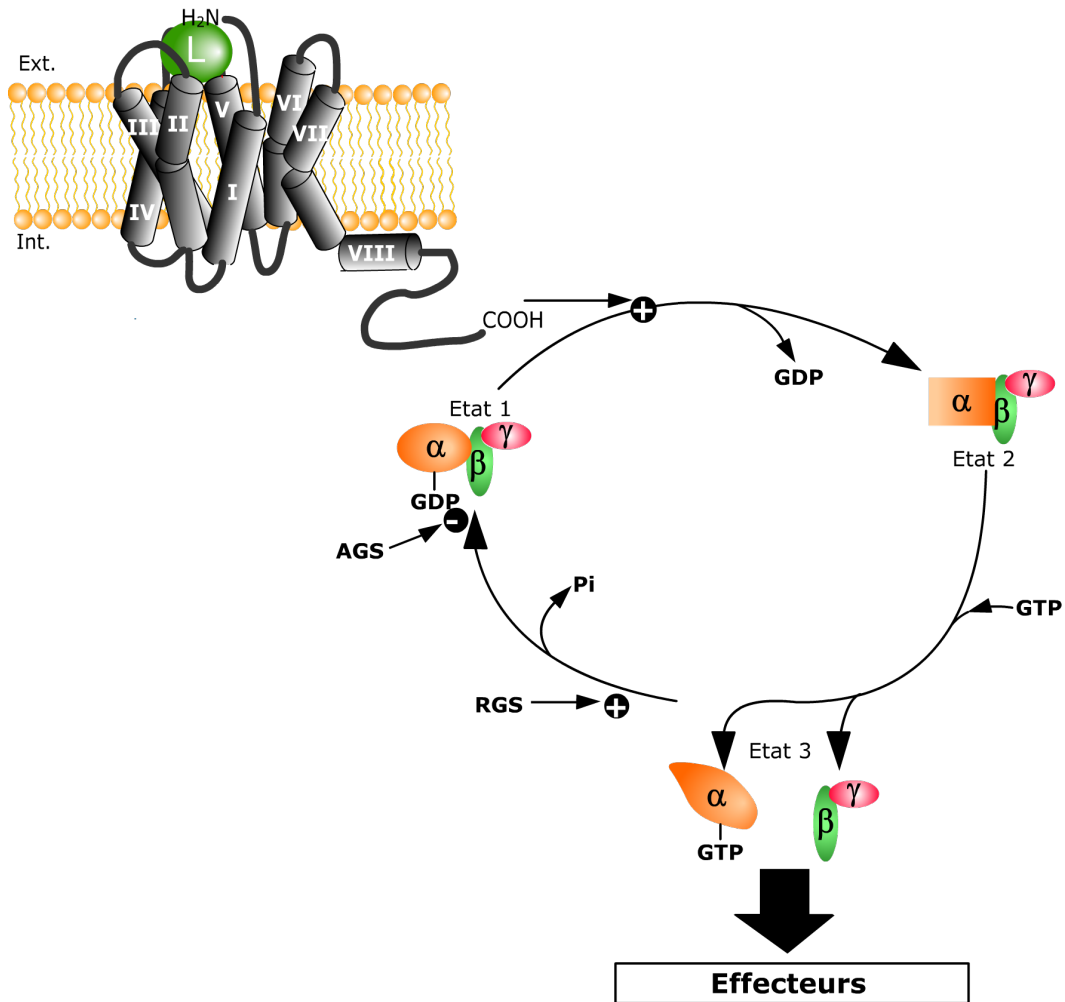


FIGURE 2.8 – Le cycle fonctionnel des protéines G. En absence d'activation par les GPCR, les protéines G forment un complexe hétérotrimérique, la sous-unité α étant liée au GDP (état 1). La stimulation d'un GPCR entraîne l'échange de GDP par GTP (état 2 puis 3). Les sous-unités interagissent alors avec différents effecteurs (état 3). La sous-unité α hydrolyse le GTP en GDP et s'associe à nouveau avec les sous-unités $\beta\gamma$ (état 1).

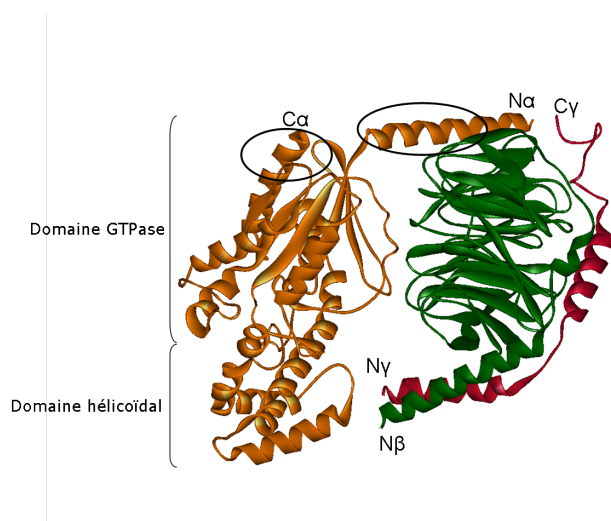


FIGURE 2.9 – Structure des protéines G hétérotrimériques. La sous-unité α est symbolisée en orange, β en vert et γ en rouge [163]. Les parties entourées (N-ter et C-ter de α) sont impliquées dans l'interaction avec le récepteur. Code PDB : 1GOT.

- $G\alpha_s$: Il contient plusieurs sous-types de protéines $G\alpha_s$ et la $G\alpha_{olf}$ qui est couplée aux récepteurs olfactifs. Ces sous-unités sont capables de stimuler l'adénylate cyclase provoquant ainsi l'augmentation du taux d'AMPc. L'AMPc active ensuite une enzyme, la PKA, qui régule l'activité d'autres protéines en les phosphorylant.
- $G\alpha_{i/o}$: Trois protéines $G\alpha_i$, deux $G\alpha_t$, deux $G\alpha_o$, une $G\alpha_z$ et une $G\alpha_{gus}$ appartiennent à ce type. Elles sont capables, entre autres, d'inhiber l'adénylate cyclase ou les canaux Ca^{2+} voltage dépendants. Elles peuvent de plus activer des canaux Cl^- , K^+ ou encore la GMPc phosphodiesterase...
- $G\alpha_q$: Il existe cinq sous-types de protéines $G\alpha_q$ qui activent tous la phospholipase C. Cette enzyme hydrolyse le PIP_2 présent à la membrane en diacylglycérol (DAG) et IP_3 . Ce dernier déclenche alors l'augmentation de $[Ca^{2+}]$ intracellulaire. Le DAG, quant à lui, active la PKC.
- $G\alpha_{12,13}$: Les protéines $G\alpha_{12,13}$ activent, quant à elles, la phospholipase A2, des canaux Ca^{2+} de type L et la kinase c-Jun.

2.2.1.2 Les sous-unités $\beta\gamma$

Les sous-unités $\beta\gamma$, contrairement aux sous-unités α , ne présentent pas d'activité catalytique. Elles sont en revanche capables d'interagir avec de nombreux effecteurs (tab. 2.3) et participent ainsi à la transduction du signal. Les sous-unités β sont au nombre de six tandis que le type γ compte 12 membres. Elles sont respectivement codées par cinq et douze gènes différents [128]. Leurs masses moléculaires sont com-

Type	Sous-type	Effecteurs
α_S	$\alpha_{SL1}, \alpha_{SL2}, \alpha_{SS1}, \alpha_{SS2}, \alpha_{Olf}$	Adénylate cyclase(+)
$\alpha_{i/o}$	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3},$	Adénylate cyclase (-), Canaux Cl^- et K^+
	$\alpha_{t1}, \alpha_{t2}, \alpha_{Gus}$	(+), Phospholipases C et A2 (+)
	$\alpha_{o1}, \alpha_{o2},$	GMPc Phosphodiesterase (+)
	α_z	Canaux Ca^{2+} voltage dépendants (-), canaux K^+ (+)
$\alpha_{q,11}$	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Adénylate cyclase (-)
$\alpha_{12,13}$	α_{12}, α_{13}	Phospholipase C (+)
		Phospholipase A2 (+), c-Jun Kinase (+), Canaux Ca^{2+} (L) (+)

TABLE 2.2 – Sous-unités des protéines $G\alpha$ et leurs effecteurs. (+) : activation de l'effecteur, (-) : inhibition.

Type	Sous-type	Effecteurs
β	β_1 à β_6	Phospholipases C et A2 (+)
γ	γ_1 à γ_{12}	Adénylates cyclases I (-), II et IV (+), GIRK (+), Canaux Ca^{2+} (N,P,Q) (-), MAPK(+), Canaux Na^+ , c-Jun kinase (+), PI_3 kinase (+), PKC et PKD (+)

TABLE 2.3 – Sous-unités des protéines $\beta\gamma$ et leurs effecteurs. (+) : activation de l'effecteur, (-) : inhibition.

prises entre 35 et 37 kDa (β) et 6 et 8 kDa (γ). La structure du complexe $\beta\gamma$ a été déterminée en 1996 par Sondek *et al.* [286]. Ainsi, il a été montré que la sous-unité β présente un domaine " β -propeller" et γ interagit avec β par l'intermédiaire de sa partie N-ter qui forme un "coiled coil" (fig.2.9). $\beta\gamma$ sont associées à α au niveau d'une poche hydrophobe présente dans cette dernière lorsqu'elle est liée au GDP. De plus, il semblerait que, lors de la dissociation $\alpha/\beta\gamma$, les sous-unités $\beta\gamma$ ne changent pas de conformation [286, 323]. Dans cette optique, la séparation des protéines G aurait pour rôle de rendre accessible certaines zones de $\beta\gamma$ à certains partenaires d'interaction.

L'adressage membranaire de $\beta\gamma$ serait possible suite à l'association avec α . En effet, la prénylation de γ en C-ter n'est pas suffisante pour permettre à $\beta\gamma$ d'interagir avec la membrane plasmique [300]. Le tableau 2.3 recense les principaux effecteurs de ces protéines.

2.2.2 La signalisation indépendante des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques ne sont pas les seuls acteurs de la transduction du signal. La fin des années 90 a vu émerger de nombreux partenaires d'interaction

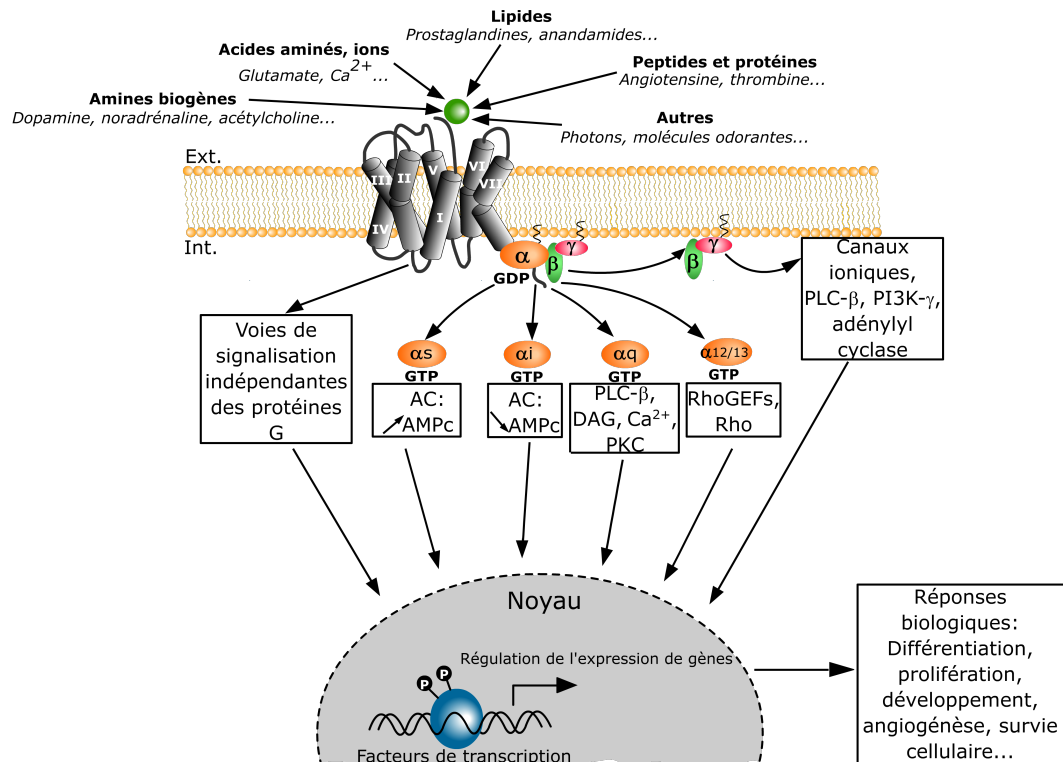


FIGURE 2.10 – Voies de signalisation des GPCR. Les GPCR peuvent être activés par différents types de ligands (sphère verte). Cette activation catalyse l'échange de GDP par GTP au niveau de la sous-unité α . Cet événement est suivi par la dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$ qui déclenchent ensuite des voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Ces cascades aboutissent, en général, à la régulation de l'expression de certains gènes permettant ainsi une réponse à l'échelle cellulaire.

des GPCR ayant un rôle tout aussi important dans la transmission de l'information que les protéines G hétérotrimériques. Quelques partenaires sont décrits ci-dessous.

2.2.2.1 Les β -arrestines

Suite à l'activation par un ligand, un GPCR est phosphorylé par une GPCR kinase (GRK, fig. 2.11). Cette phosphorylation permet aux β -arrestines d'interagir avec le GPCR. Ce phénomène éteint alors toute communication avec les protéines G [168]. La désensibilisation est alors engrangée, le récepteur n'est plus capable de communiquer avec les protéines G et est ensuite internalisé par l'intermédiaire des puits de clathrine (cf. section 2.3.5).

Mise à part cette fonction de désensibilisation des GPCR, la β -arrestine possède un autre rôle. En effet, elle détourne le GPCR des protéines G pour pouvoir parvenir à ses fins qui consistent en l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaires. Ainsi, une de ces voies a été identifiée en utilisant le récepteur β_2 adrénergique [181]. Il s'agit de la voie Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase qui nécessite l'activation de la famille Src des tyrosine kinases pour être enclenchée. La microscopie confocale et la co-immunoprécipitation ont été utilisées pour montrer que, suite à la liaison de l'agoniste du récepteur β_2 adrénergique, Src, la β -arrestine 1 et le récepteur se trouvaient localisés au même endroit. Il a ainsi pu être déterminé que la β -arrestine 1 jouait un rôle d'adaptateur pour Src. Une fois le complexe protéique formé, il est délocalisé au niveau des puits de clathrine. C'est uniquement dans ces conditions que l'activation de la voie de signalisation MAP kinase (ERK) est possible. Cette propriété de la β -arrestine a également été montrée avec le récepteur de type I à l'angiotensine II et CXCR4 [308, 292]. D'autres partenaires d'interaction de la β -arrestine ont été identifiés tels que la kinase C-Jun N-ter [192].

2.2.2.2 Les protéines Homer

La protéine Homer 1a fut identifiée par Brakeman *et al.* au cours d'une étude sur les protéines et les molécules impliquées dans la plasticité neuronale [40]. Il s'agit d'une protéine d'environ 180 acides aminés qui contient un domaine EVH (Ena Vasp Homology 1) au niveau de son extrémité N-terminale. Les méthodes de double-hybride et de co-immunoprécipitation ont permis d'identifier le récepteur glutamate mGluR5 comme étant l'un de ses partenaires d'interaction (motif PPxxF). L'homologie de séquence entre mGluR5 et mGluR1 a mené à la conclusion que ce dernier interagissait aussi avec Homer. Il existe plusieurs protéines Homer : Homer 1a, qui ne possède pas de région "coiled coil" tandis que Homer 1b, c, 2 et 3 en présentent une. Homer 1a joue le rôle de dominant négatif en interagissant avec mGluR5 et mGluR1. En effet, il bloque ainsi l'accès à Homer 1b, c, 2 ou 3 et empêche la communication

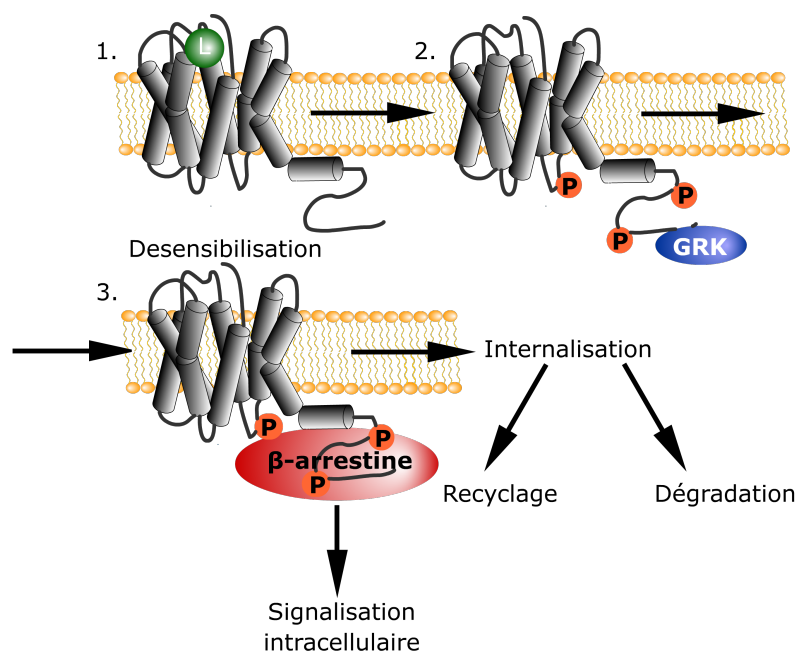


FIGURE 2.11 – Mode d'action de la β -arrestine. (1) Le ligand se fixe sur le GPCR et l'active. (2) Une GPCR kinase (GRK) phosphoryle le récepteur. (3) La β -arrestine est alors capable de se lier au GPCR et amène le complexe protéique au niveau des puits de clathrine. La β -arrestine peut déclencher différentes voies de signalisation. Le GPCR est ensuite soit recyclé, soit dégradé.

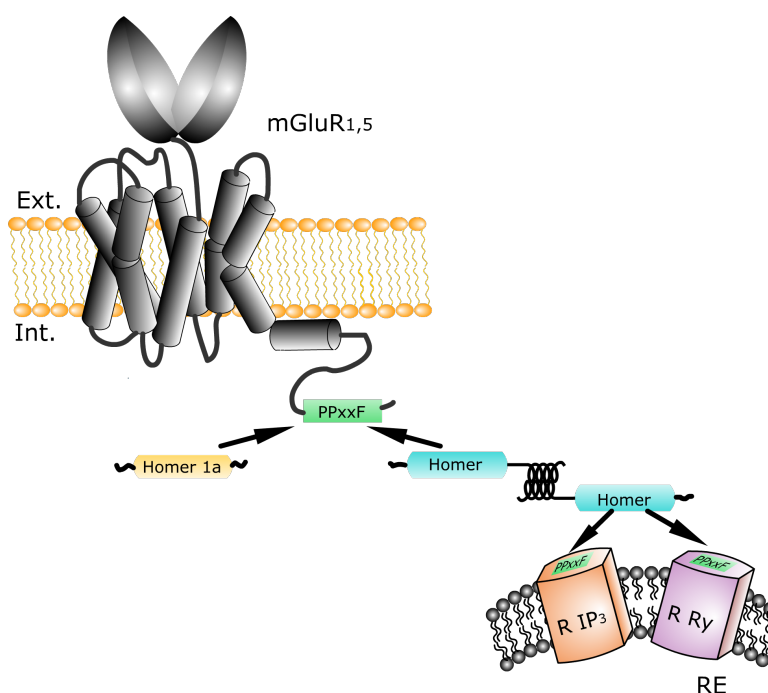


FIGURE 2.12 – Interaction entre le récepteur glutamate métabotrope et les protéines Homer.

entre les mGluR et le récepteur de l'IP₃ (RIP₃) et/ou de la ryanodine (RRy) [312] (fig. 2.12). Ainsi, mGluR1 et 5 sont capables d'influencer le relargage de calcium intracellulaire via les récepteurs de la ryanodine et de l'IP₃. Homer 1a assure, dans ce système, la modulation de la libération du Ca²⁺ intracellulaire.

2.2.2.3 JAK–STAT

L'activation directe de cette voie de signalisation a tout d'abord été mise en évidence avec les récepteurs des cytokines. Le mécanisme est le suivant : lorsqu'un ligand se lie sur les récepteurs des cytokines, ces derniers dimérisent, sont phosphorylés et capables d'interagir avec des kinases de la famille Janus (JAK). Une phosphorylation croisée a lieu entre deux JAK qui phosphorylent alors les récepteurs. Les STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) peuvent alors s'assembler au complexe Récepteur/JAK et sont phosphorylés par les JAK. S'ensuit une dissociation de l'assemblage multiprotéique, STAT pouvant alors être transloqué vers le noyau [263]. Un phénomène semblable a ensuite été observé avec certains GPCR et plus précisément avec le récepteur 5HT_{2A} et le récepteur de type 1 à l'angiotensine II [186], [8]. L'étude de l'activation de la voie JAK–STAT par 5HT_{2A} a été menée sur des cellules de muscle squelettique de rat, et a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe 5HT_{2A}/JAK2/STAT3 [103]. Une fois STAT3 phosphorylé par

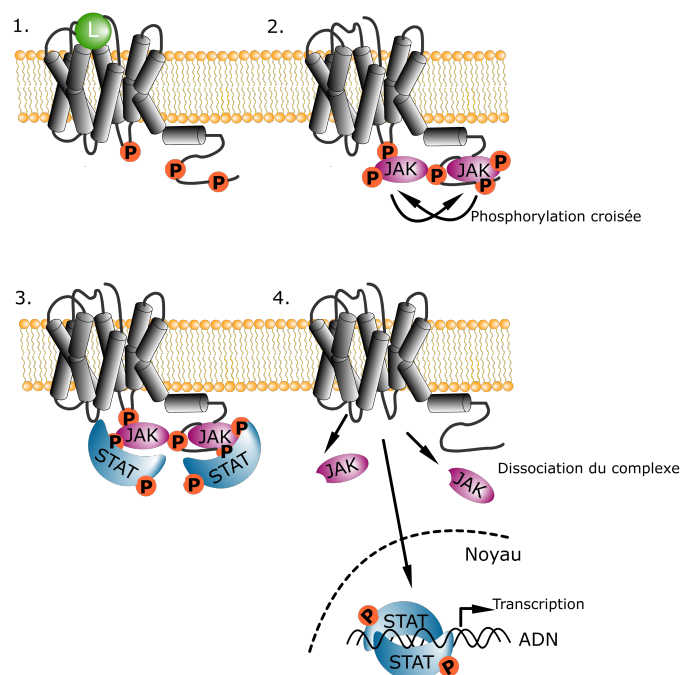


FIGURE 2.13 – Activation de la voie JAK–STAT indépendante des protéines G par les GPCR. (1) Le GPCR est activé par son ligand et phosphorylé par une GRK. (2) JAK peut alors interagir avec le récepteur et s’auto-phosphoryler. (3) Ce phénomène permet à STAT de s’ajouter au complexe et d’être par conséquent phosphorylé par JAK. (4) Le complexe se dissocie et STAT peut alors atteindre le noyau où il se lie à l’ADN et engendre la transcription de certains gènes.

JAK2, celui-ci induit l’expression de certains gènes aboutissant à la différenciation myogénique (fig.2.13). Le même mode opératoire a été observé avec le récepteur de type 1 de l’angiotensine II [186].

2.2.2.4 Régulation de l’activité de l’échangeur de Na^+/H^+

L’échangeur Na^+/H^+ (NHE), qui régule le pH et le volume des cellules chez les mammifères, est inhibé par la protéine NHERF (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor). NHERF possède un domaine PDZ qui a été identifié comme interagissant avec la partie C-terminale du récepteur β_2 adrénergique au niveau du motif [DS/TxL] [106, 107]. Lorsque le récepteur est activé par son ligand, ce motif devient accessible à NHERF et entre en compétition avec le site de liaison présent sur l’échangeur Na^+/H^+ (fig.2.14). L’inhibition provoquée par NHERF est alors levée et le transport de Na^+ et H^+ peut avoir lieu. De plus, il est connu que NHERF est capable d’empêcher le fonctionnement de l’échangeur par l’intermédiaire d’un mécanisme PKA-dépendant. Le récepteur β_2 adrénergique étant couplé en majeure partie aux protéines $\text{G}\alpha_s$, sa stimulation entraîne l’activation de la PKA. Ceci devrait diminuer

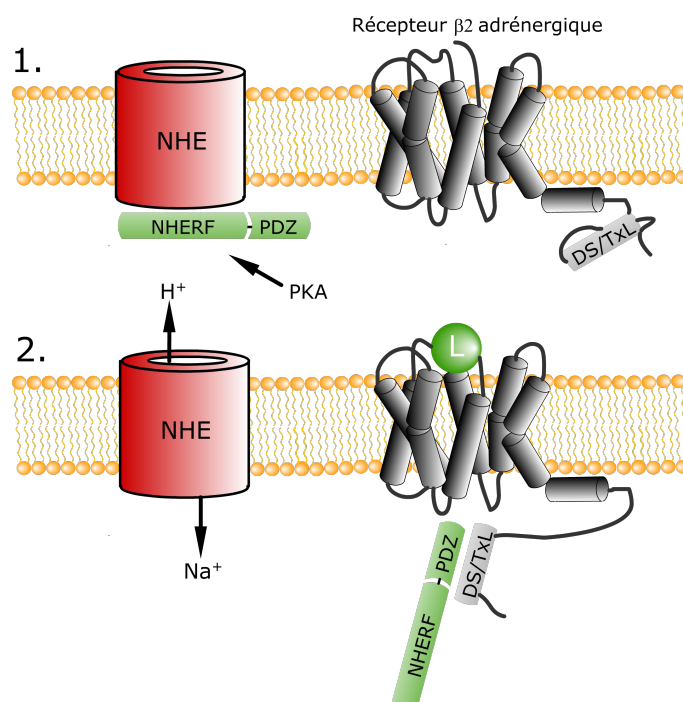


FIGURE 2.14 – Régulation de l'échangeur de Na⁺/H⁺ (NHE) par le récepteur β₂ adrénergique. (1) En absence d'activation du ligand, NHERF inhibe NHE. (2) La fixation du ligand sur le récepteur améliore l'accessibilité du motif DS/TxL présent en C-ter. Celui-ci est alors capable d'interagir avec NHERF, par l'intermédiaire de son domaine PDZ.

l'échange de Na⁺/H⁺, mais c'est en fait l'effet inverse qui prédomine.

2.2.3 Réponses induites à l'échelle cellulaire

Toutes ces cascades de signalisation intracellulaires, qu'elles fassent intervenir les protéines G ou non, induisent diverses réponses à l'échelle de la cellule. Ainsi, l'activation des voies MAP kinases aboutissent à la prolifération, la différenciation, le développement ou encore à l'apoptose... La fixation d'un ligand sur un GPCR peut également provoquer la modification de la forme de la cellule, l'altération de l'adhésion ou encore la migration des cellules. C'est le cas, par exemple, du récepteur CXCR4 qui est couplé aux protéines Gα_{i/o}. Lorsqu'il est stimulé par SDF-1, il se produit l'activation d'une part, des petites protéines G Rho [303] et, d'autre part de la PI3K [60]. S'ensuit alors la modulation du cytosquelette d'actine [303, 57].

En outre, certains récepteurs couplés Gα_q sont capables de réguler la libération du Ca²⁺ intracellulaire. En effet, cette voie active la phospholipase C, qui hydrolyse le PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ se lie alors à des récepteurs se trouvant au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique libérant ainsi le Ca²⁺.

2.3 Régulation de l'expression et de l'activité des GPCR

2.3.1 Adressage membranaire

Avant d'arriver à la membrane plasmique, un GPCR doit être acheminé par plusieurs organites : le réticulum endoplasmique (RE), le compartiment intermédiaire du Golgi puis l'appareil de Golgi. A chacune de ces étapes, qui peuvent être représentées par des portes, le récepteur se doit de posséder les bonnes clés lui permettant d'avancer dans son périple jusqu'à la membrane.

2.3.1.1 Domaines et motifs impliqués dans l'adressage membranaire

Partie C-terminale Plusieurs séquences, localisées dans la partie C-terminale, ont été identifiées comme étant impliquées dans l'adressage membranaire. Parmi elles, on compte les motifs dileucine dont $E(X)_3LL$ qui joue un rôle dans l'expression membranaire du récepteur à la vasopressine V2R [268] et DSL qui intervient dans le recyclage du récepteur β_2 adrénergique [88]. Le récepteur dopaminergique D1 possède un motif $F(X)_3F(X)_3F$ qui est nécessaire à son adressage membranaire [31]. En outre, $F(X)_6LL$ possède une certaine importance pour l'expression des récepteurs suivants : α_{2B} adrénergique, β_2 adrénergique, α_{1B} adrénergique et ATR1 [77, 72].

Partie N-terminale Suivant les GPCR, la délétion du domaine N-terminal peut avoir deux effets opposés : une diminution ou une augmentation de l'expression de surface. Ainsi, la suppression en N-ter d'une séquence d'acides aminés dans le cas des récepteurs α_{1D} adrénergique et cannabinoïde 1 entraîne une amélioration de leur adressage [240, 10] et ce probablement en facilitant la translocation de ces récepteurs au niveau du RE.

2.3.1.2 Chaperonnes

L'interaction entre les protéines chaperonnes et les GPCR est capitale dans le cadre du contrôle qualité qui a lieu au niveau du RE. Trois protéines principales ont été identifiées comme assurant ce rôle : la calnexine, la calreticuline et BiP. Elles sont responsables du repliement correct des protéines nouvellement synthétisées et empêchent les récepteurs mal repliés d'atteindre la membrane.

2.3.2 Oligomérisation

2.3.2.1 Rôle dans l'adressage membranaire

L'influence de l'oligomérisation sur la présence d'un récepteur à la membrane plasmique peut prendre plusieurs formes. Dans certains cas, l'association de GPCR différents est nécessaire pour leur permettre d'atteindre la membrane tandis que,

dans d'autres cas, cette association aboutit à la régulation de l'internalisation des récepteurs.

Un exemple du premier cas de figure est celui des récepteurs GABA (famille Glutamate/C). En effet, lorsque GABAbR1 est exprimé seul dans un système hétérologue, la réponse à l'agoniste est supprimée, fait attestant de l'absence du récepteur à la membrane [328]. GABAbR1 est en fait bloqué dans un compartiment intracellulaire. Afin de pallier ce défaut d'expression, la co-expression avec un second GPCR, GABAbR2 est nécessaire [183]. Il a été montré que les deux récepteurs interagissaient, entre autres, via leur partie C-terminale (méthode de double hybride) permettant ainsi de restaurer l'adressage membranaire et la réponse à l'agoniste [329], [184]. Des expériences de co-immunoprécipitation sur des extraits de cerveau ont permis de montrer l'existence de ces complexes *in vivo* [199]. L'hétérodimérisation de GABAbR1 et GABAbR2 est donc essentielle à la localisation membranaire de ces GPCR. Un autre exemple illustrant l'influence de l'oligomérisation des GPCR est celui des récepteurs du goût (TR). Il est nécessaire de co-exprimer T1R2 et T1R3 ou T1R1 et T1R3 pour pouvoir assurer l'adressage membranaire et observer des réponses à l'application d'acides aminés lévogyres [215, 342].

L'étude de la co-expression et de l'association de plusieurs récepteurs a permis de mettre en évidence le fait que l'oligomérisation pouvait être à l'origine de la régulation de l'internalisation de GPCR. Ainsi, le récepteur β_2 adrénergique et le récepteur δ -opioïde, qui sont tous deux présents dans le muscle cardiaque [332], régulent de façon croisée leur internalisation. En effet, l'ajout d'etorphine (agoniste du δ -opioïde) provoque l'internalisation concentration-dépendante du récepteur β_2 adrénergique et inversement [144].

2.3.2.2 Rôle dans la transduction du signal

Les homo/hétérodimères de GPCR auraient des propriétés pharmacologiques différentes de celles des monomères. En effet, il a pu être observé des modifications de la pharmacologie d'un ligand ou encore de la nature des signaux engendrés... L'hétérodimérisation peut induire un changement de spécificité du couplage aux protéines G. Ainsi, la co-expression des récepteurs D1 et D2, respectivement couplés $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$, entraîne l'activation de la voie $G\alpha_q$ lorsqu'ils sont stimulés [166]. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de PKA, de PKC ou l'application de toxine pertussique n'ont aucun effet sur la signalisation calcique alors qu'un inhibiteur de PLC l'abolit. La co-immunoprécipitation et la microscopie confocale ont démontré que les deux GPCR formaient un complexe dans les cellules extraites de cerveau de rat et dans des systèmes d'expression hétérologue. Les récepteurs μ et δ opioïdes sont également un exemple de ce type de phénomène. Ils sont séparément couplés $G\alpha_{i/o}$ et leur association déplace le couplage vers $G\alpha_z$ [89, 91].

2.3.3 Désensibilisation

Pour un même GPCR, il existe deux voies de désensibilisation : l'une résultant de l'activation d'un GPCR par un ligand et l'autre de l'activation d'un autre récepteur dans la même cellule.

2.3.3.1 Désensibilisation homologue

La désensibilisation dite homologue d'un GPCR est le résultat de son activation par un ligand (agoniste). Cette activation entraîne un changement de conformation qui permet à une enzyme, la GRK d'interagir avec le récepteur. Les GRK sont des Ser/Thr kinases qui possèdent plusieurs sites de phosphorylation au niveau des boucles intracellulaires (ICL2 et ICL3) et de la partie C-terminale du GPCR. La mise en évidence d'un tel mécanisme a été menée, dans un premier temps avec la rhodopsine puis avec le récepteur β_2 adrénergique. Il existe six GRK : GRK1 (kinase de la rhodopsine), GRK2 (β_2 adrénergique, 1), GRK3 (β_2 adrénergique, 2), GRK4, GRK5 et GRK6. Ces kinases, à part GRK1 et GRK4 sont exprimées de manière très étendue. Leur domaine catalytique se situe au centre de la protéine et comprend environ 260 acides aminés. En outre, elles présentent une partie N-terminale qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance des GPCR (domaine RGS). Les GRK sont caractérisées par trois attributs [235] :

- Elles reconnaissent spécifiquement le complexe GPCR–agoniste et pas le GPCR inactif ou couplé à un antagoniste.
- Elles sont suractivées par l'interaction avec le complexe GPCR–agoniste.
- L'action de ces enzymes nécessite des protéines partenaires permettant leur adressage à la membrane et aux récepteurs.

La phosphorylation par les GRK engendre alors la liaison de l'arrestine au niveau de la partie intracellulaire du récepteur. Cet événement est à l'origine du découplage puisqu'il bloque l'accès de la sous-unité α [82].

2.3.3.2 Désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue est beaucoup moins sélective que la désensibilisation homologue. Ce mécanisme fait appel à des kinases (PKA, PKC) qui sont activées par les messagers secondaires. Ces enzymes phosphorylent tous les récepteurs présents à la membrane sans discriminer l'état actif de l'état inactif. Ainsi, dans une cellule, un récepteur peut être activé par son ligand et entraîner la désensibilisation d'un autre GPCR présent dans cette même cellule. Tout comme les GRK, la PKA et la PKC catalysent la phosphorylation des résidus Ser/Thr qui se situent au niveau des boucles intracellulaires et de la partie carboxy-terminale. Le mode opératoire est semblable à celui des GRK : la présence des groupements phosphate

recrute les arrestines qui empêchent la communication entre le GPCR et les protéines G hétérotrimériques.

2.3.4 Régulation négative

Le phénomène de régulation négative a lieu en réponse à une exposition prolongée à un ligand. Cela permet de prévenir les effets toxiques induits par une suractivation des récepteurs [311]. La régulation négative se traduit par une diminution de la densité de récepteurs à la membrane et revêt différents aspects :

- Une altération de l'activité transcriptionnelle ou traductionnelle.
- Une modification à la hausse de la dégradation des GPCR.

De plus, ce phénomène présente une cinétique plus lente (plusieurs heures) que la désensibilisation [113].

2.3.5 Internalisation

L'internalisation des GPCR suite à leur activation a pour but de réguler de manière fine la signalisation. Le mécanisme d'internalisation le plus courant est celui réalisé par l'intermédiaire des puits de clathrine. A l'issue de ce phénomène, le récepteur est soit dephosphorylé puis restitué à la membrane plasmique, soit internalisé dans le lysosome pour y être dégradé.

Suite à la stimulation d'un GPCR par un ligand, la liaison de l'arrestine, outre son rôle dans la signalisation indépendante des protéines G (cf. section 2.2.2.1), est capable d'entraîner l'internalisation du GPCR et ce, en association avec d'autres protéines telles que la clathrine. Cette dernière est une protéine composée de trois chaînes lourdes et trois chaînes légères qui est impliquée dans la formation des vésicules. La co-localisation du récepteur β_2 adrénergique, de la clathrine et de l'arrestine 2 a été mise en évidence en 1996 par Goodman *et al.* [92]. Aucun site d'interaction direct entre les GPCR et la clathrine n'a été identifié jusqu'à présent. En revanche, il a été démontré que l'arrestine et la clathrine pouvaient interagir entre-elles et également avec une troisième protéine : AP-2 ("Adaptator Protein 2") [164]. La protéine AP-2 permet non seulement l'assemblage à la membrane des molécules de clathrine mais facilite aussi le recrutement de protéines accessoires au niveau des puits du même nom [252]. Ainsi, l'arrestine, qui est capable de lier un GPCR activé et phosphorylé par la GRK, joue le rôle d'adaptateur entre le récepteur et les acteurs de l'internalisation (clathrine et AP-2). La formation de ce complexe aboutit à la migration du GPCR vers les puits de clathrine. Se forment alors les vésicules de clathrine qui sont détachées de la membrane par une GTPase, la dynamine (fig. 2.15).

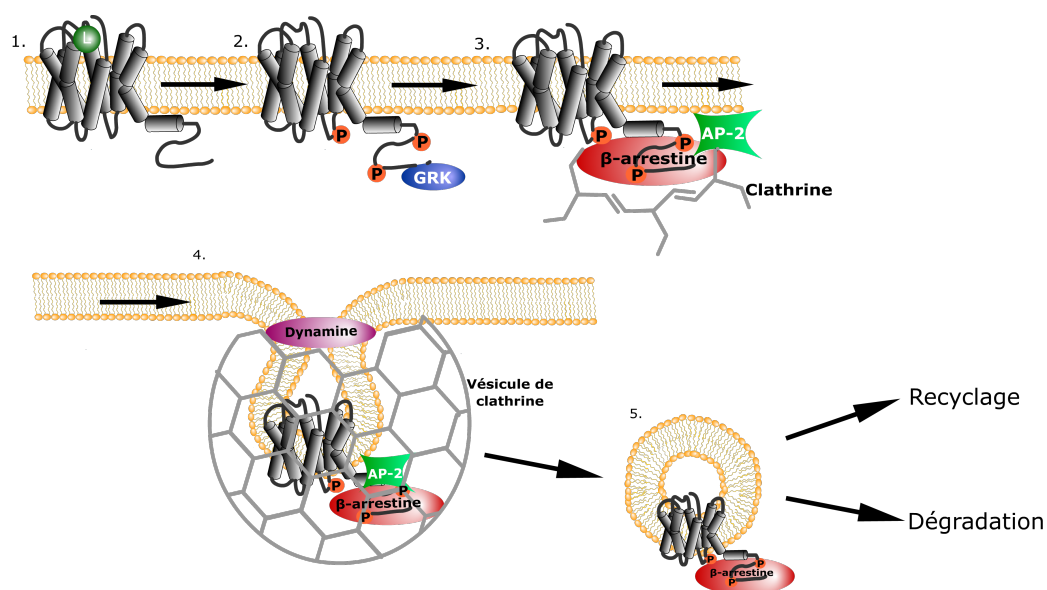


FIGURE 2.15 – Internalisation des GPCR par la voie des clathrines. (1) Le GPCR est activé par son ligand. (2) La GRK phosphoryle le récepteur. (3) La β arrestine interagit avec le GPCR et recrute AP-2 et des molécules de clathrine. (4) Le GPCR est re-localisé au niveau des puits de clathrine où se forme alors une vésicule. (5) La vésicule est libérée sous l'action de la dynamine et le récepteur est ensuite soit recyclé soit dégradé dans le lysosome.

2.4 Les GPCR, cibles pharmaceutiques de choix

2.4.1 Pathologies associées

Comme cela a été exposé au cours des sections précédentes, les GPCR, chez un sujet sain, sont au centre d'un grand nombre de processus physiologiques. Ainsi, le moindre dysfonctionnement, dû à des mutations, peut être à l'origine de certaines pathologies. A l'heure actuelle, on dénombre plus de trente pathologies associées à des mutations de GPCR [267]. L'effet d'une mutation sur un GPCR peut se manifester à différentes étapes de sa vie :

- Au niveau chromosomique (délétion d'un gène ou mutation au niveau d'un promoteur).
- Altération de la transcription (ARNm instable, mutation non-sens ou faux-sens).
- Défaut d'adressage (mauvais repliement de la protéine, ne passe pas le contrôle qualité du RE).
- Modification de la signalisation (moindre affinité pour le ligand, activité constitutive accrue).

Lorsqu'un mutant de GPCR a franchi les trois premières étapes, la mutation peut se traduire de deux manières différentes : soit une perte de fonction du récepteur, soit un gain de fonction. En général, les maladies associées à la perte de fonction sont héréditaires et récessives tandis que les mutations gain de fonction se manifestent au cours de la vie (hérédité très rare à cause du taux de survie faible). A titre d'exemple, la rétinite pigmentaire, maladie visuelle, résulte d'une centaine de mutations perte de fonction au niveau de la rhodopsine. En revanche, une mutation gain de fonction au niveau du même récepteur a pour conséquence la cécité nocturne congénitale. De plus, il a été montré qu'une mutation perte de fonction du récepteur de la vasopressine (AVPR2 est à l'origine du diabète insipide lié au chromosome X. En effet, AVPR2 est exprimé dans le rein et son insensibilité à la vasopressine aboutit à une diminution de la concentration des urines ce qui entraîne des risques de déshydratation. En outre, certaines mutations gain de fonction ont été identifiées comme étant à l'origine de carcinomes ou de tumeurs malignes (cf. tableau 2.4).

2.4.2 Médicaments

Comme le montre la section précédente, les dysfonctionnements liés aux GPCR sont la source d'un grand nombre de pathologies. C'est une des raisons pour laquelle le budget des médicaments prescrits ciblant ces récepteurs représente 60% de celui de tous les médicaments [267]. En considérant la diversité de localisation et de fonction des GPCR, il est logique que les effets de ces molécules thérapeutiques soient assez variés. En effet, parmi ces médicaments, on trouve des anti-psychotiques, des

Mutations gain de fonction	
Rhodopsine	Cécité nocturne stationnaire congénitale
Thyrotropine	Hyperthyroïdie, carcinome thyroïdien
Follitropine	Syndrome d'hyperstimulation ovarienne
Lutropine	Puberté précoce limitée
Mutations perte de fonction	
Rhodopsine	Rétinite pigmentaire
Angiotensine (AT ₂)	Retard mental lié au chromosome X
Vasopressin (V2)	Diabète insipide
Melanocortine (MC ₄)	Obésité

TABLE 2.4 – Pathologies associées à des mutations gain de fonction ou perte de fonction, d'après Schöneberg *et al.* [267].

β -bloquants, des anti-histaminiques, des traitements contre l'obésité, des analgésiques... En 2005, environ 30% des médicaments approuvés par la "Food and Drug Administration" (FDA) étaient destinés à agir sur les GPCR [229]. Ces cibles constituent donc un enjeu tant thérapeutique que financier pour l'industrie pharmaceutique.

2.5 GPCR étudiés

2.5.1 Récepteur β_2 adrénergique

Le récepteur β_2 adrénergique est majoritairement couplé $G\alpha_s$. Cependant, après activation, la spécificité du couplage peut être déplacée vers $G\alpha_i$ sous l'influence d'un mécanisme PKA dépendant [61]. Le GPCR humain contient 413 acides aminés. Le récepteur β_2 adrénergique de hamster fut cloné en 1986 [71]. Il est activé par des molécules naturelles telles que l'adrénaline ou la noradrénaline. En outre, de nombreuses molécules synthétiques ciblent ce récepteur dans un but thérapeutique (ex : timolol pour le traitement du glaucome).

Etant couplé $G\alpha_s$, son activation engendre la stimulation de l'adénylyl cyclase. Le taux d'AMPc intracellulaire augmente alors, ce qui a pour conséquence l'activation de la PKA. Cette kinase phosphoryle différentes protéines assurant la propagation de la signalisation intracellulaire. Chez l'Homme, le récepteur est exprimé dans de nombreux organes tels que les poumons, les reins, le foie, les yeux, le cœur... De par son omniprésence dans l'organisme, le récepteur β_2 adrénergique présente des fonctions très diversifiées. En effet, il est impliqué dans la régulation du rythme cardiaque (augmentation), de la tension oculaire (flux et production d'humeur aqueuse), la relaxation utérine, la diminution de la tension artérielle (hypotension), la bronchodilation... Certaines de ces actions sont dues au fait que l'activation du récepteur

β_2 adrénergique entraîne la relaxation des muscles lisses.

2.5.2 Récepteur dopaminergique D3

Le récepteur dopaminergique D3 (D3) est couplé aux protéines $G\alpha_{i/o}$. Chez l'Homme, il comprend 400 acides aminés. Il fut cloné pour la première fois en 1990 [285]. Son activation par la dopamine entraîne la stimulation des voies de signalisation classiques des récepteurs couplés $G\alpha_i$ (activation des canaux Kir3.x, de la voie MAP kinase, inhibition de l'adénylate cyclase). Il existe deux isoformes de D3 (D3_L : forme longue, D3_S : forme courte), obtenues par épissage alternatif au niveau de la boucle ICL3 [83]. D3 est majoritairement exprimé dans le système nerveux central et plus particulièrement au niveau du nucleus accumbens. D'un point de vue physiologique, D3 est impliqué dans certaines fonctions cognitives telles que l'émotion et la kinésie. Ce rôle en fait, en cas de dysfonctionnement (sur-expression, diminution de la libération de dopamine), un acteur central de certains troubles neuropsychiatriques (schizophrénie) ou neurologiques (maladie de Parkinson) [145]. A titre d'exemple, la recherche de médicaments contre la schizophrénie s'oriente vers la découverte d'antagonistes qui se lient préférentiellement à D3 [146].

2.5.3 Récepteur cannabinoïde 1

Le récepteur cannabinoïde 1 (CB1), cloné en 1990 [190], est exprimé dans le système nerveux central (cortex cérébral, hippocampe, hypothalamus...) mais également au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, des tissus adipeux... CB1 est principalement couplé aux protéines $G\alpha_i$. Il a en outre été démontré que, suivant la nature de l'agoniste utilisé, le couplage aux protéines G pouvait varier (au sein du sous-type $G\alpha_i$) [210]. Lorsqu'il est activé par des composés cannabinoïdes endogènes (anandamide, 2-arachidonyl glycérol) ou exogènes (Δ -9-tetrahydrocannabinol), cela provoque une inhibition de l'adénylate cyclase, des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, une activation des canaux Kir3.x ainsi que des voies MAP kinases.

Les conséquences physiologiques de son activation fluctuent suivant les tissus dans lesquels il est exprimé. En effet, sa présence au niveau de l'hippocampe lui assigne un rôle important dans le processus d'apprentissage et de mémorisation [87]. Dans l'hypothalamus, CB1 est responsable de la régulation de la prise de nourriture car la sécrétion de composés cannabinoïdes endogènes en période de jeûne entraîne une augmentation de l'appétit et a également un effet anti-émétique. De plus, l'activation de CB1 dans le foie, les adipocytes et les cellules endocrines du pancréas promeut la lipogénèse, le stockage des lipides et la sécrétion d'insuline [320]. Son implication dans ces phénomènes en a fait une cible thérapeutique pour le traitement de l'obésité. En effet, plusieurs médicaments comme le Rimonabant (agoniste inverse) ont été mis

sur le marché puis retirés de la vente à cause des effets secondaires (notamment psychiatriques). Le fait que CB1 soit exprimé dans une multitude d'organes est à l'origine de ce phénomène.

2.5.4 Rhodopsine

La rhodopsine, avec le récepteur β_2 adrénergique, représente l'un des GPCR les plus étudiés. Elle est exprimée dans les cellules qui tapissent la rétine appelées bâtonnets qui sont responsables de la vision en faible luminosité. Elle constitue environ 90% des protéines totales de ces cellules. Cette propriété en fait une protéine qui peut être purifiée de manière relativement aisée à partir de tissus natifs et témoigne de sa stabilité. Elle fut clonée en 1982 [228]. La rhodopsine est couplée à un type de protéine G qui est uniquement exprimé dans les cellules visuelles : la transducine (G_{α_t}). Dans l'obscurité, la rhodopsine est liée de manière covalente au retinal 11-cis qui forme une base de Schiff avec la Lys296. Les bâtonnets sont alors dépolarisés à cause de l'ouverture de canaux cationiques activés par les nucléotides cycliques (CNGC, cyclic nucleotide gated channels). Lorsqu'un photon entre en contact avec le photorécepteur, cela induit la photo-isomérisation du retinal 11-cis en rétinol tout-trans. Par la suite, des changements de conformation au niveau du récepteur se produisent et induisent l'activation de la transducine. Cette dernière active à son tour la GMPc phosphodiesterase (PDE) qui entraîne une diminution du taux de GMPc intracellulaire. Cela a pour conséquence d'inhiber les canaux CNG ce qui provoque une hyperpolarisation de la cellule.

De part son rôle dans le processus visuel, certaines mutations au niveau de la rhodopsine sont à l'origine de maladies affectant la vision, telles que la rétinopathie pigmentaire ou la cécité nocturne.

2.5.5 Récepteur des CC-chimiokines 2

Le récepteur des CC-chimiokines 2 (CCR2) est impliqué dans la réponse immunitaire. Il est exprimé par les monocytes et environ 15 % des lymphocytes T $CD4^+$. Son activation, par des chimiokines (peptides de 8 à 12 kDa) et plus précisément par CCL-2, provoque la stimulation des protéines G_{α_i} qui, à terme, induisent le phénomène de chimiotactisme à l'échelle cellulaire. Physiologiquement, le chimiotactisme permet aux cellules de l'immunité de se déplacer afin d'accéder au site de l'inflammation suivant un gradient de chimiokines. La partie N-terminale des récepteurs des chimiokines a été identifiée comme étant primordiale pour la liaison du ligand [201]. Il existe deux isoformes de CCR2 obtenues par épissage alternatif : CCR2a et CCR2b. Cette dernière est la plus représentée dans l'organisme (environ 90%) [224].

Son implication dans la réponse immunitaire explique son rôle dans certaines

maladies auto-immunes (sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde) ou dans le rejet de greffons. Son hétérodimérisation avec CCR5, co-récepteur du VIH, aurait un effet inhibiteur sur l'entrée du VIH dans les cellules [253].

Chapitre 3

Biocapteurs Faisant Intervenir des Canaux Ioniques

Les biocapteurs engendrant la formation d'un courant suite à la liaison d'une molécule biologique peuvent être divisés en deux catégories : ceux basés sur l'élaboration de pores (*e.g.* α hémolysine) modifiés et ceux constitués par des protéines de fusion et/ou des protéines modifiées chimiquement. L'intérêt de l'utilisation de canaux ioniques réside dans le fait qu'ils donnent lieu à des courants facilement mesurables.

3.1 Pores modifiés

L' α hémolysine (α HL), pore exprimé par *Staphylococcus aureus*, a donné naissance à toute une génération de biocapteurs étant capables de détecter une multitude de ligands différents. L' α HL est un pore formé par sept sous-unités identiques, arrangées autour d'un axe central. La partie transmembranaire forme un tonneau β grâce à la contribution de deux brins anti-parallèles par sous-unité. Son domaine extracellulaire est de grande taille et forme une cavité de plus grand diamètre que la partie transmembranaire. Etant donné que sa structure est connue, que les tonneaux β sont aisément modifiables et que la conductance unitaire du pore s'élève à 1 nS (dans 1 M KCl), l' α HL représente un candidat idéal pour être façonné afin d'en faire un biocapteur reconnaissant une multitude de molécules. Ainsi, au cours des précédentes années, le défi à relever a été de faire reconnaître à ce pore une multitude de molécules chimiques de natures différentes.

Ainsi, il a été démontré que la mutation en His de quatre résidus, dont les chaînes latérales pointent vers l'intérieur du pore, permet de détecter des ions métalliques bivalents [38, 39]. Des concentrations de l'ordre du nM de Zn(II) ont pu être mesurées de cette manière (fig. 3.1, (2)). De plus, chaque ion possède une signature, modifiant

le courant de façon différente et permettant son identification.

Des molécules organiques peuvent également être détectées en parant le pore d'un adaptateur constitué d'une β -cyclodextrine (interaction non-covalente) [102]. La cyclodextrine fait partie d'une famille d'oligosaccharides cycliques d'origine naturelle qui sont capables d'emprisonner des molécules organiques grâce à leur centre hydrophobe. Une fois la cyclodextrine en place dans le pore, la capture d'une molécule organique va entraîner des modifications de courant (fig. 3.1, (3)).

Un autre exemple repose sur la reconnaissance ligand-protéine. Une molécule de polyéthylène glycol de 3,4 kDa est liée de manière covalente à l'intérieur du pore et l'autre extrémité libre est liée avec le ligand (biotine) [207]. Cette dernière se déplace de part et d'autre du pore (en *cis* et *trans*) et peut être capturée par la streptavidine (protéine), ce qui provoque des variations de courant (fig. 3.1, (4)).

Ces exemples ne sont que trois parmi tant d'autres et de nombreuses molécules ont pu être détectées grâce à ce pore fonctionnalisé, comme des oligonucléotides, des anions. . .

3.2 Protéines de fusion ou mutants

3.2.1 Canaux photoactivés

Il s'agit, dans ce cas d'un récepteur ionotropique activé par le glutamate (iGluR6) modifié chimiquement [298, 223]. Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une molécule (MAG), composée d'un groupement maléimide (M, qui lie les Cys), d'un groupement azobenzène (A, composé photosensible qui change de conformation sous l'action d'un photon) et d'un glutamate (G, ligand de iGluR6). Cette molécule est capable de se lier de manière covalente, via le groupement maléimide, à une Cys introduite dans iGluR6 par mutagénèse dirigée. Lorsque l'ensemble est illuminé à une longueur d'onde de 380 nm, l'azobenzène est en conformation *cis* tandis qu'à 500 nm, il est en conformation *trans* (fig. 3.2). Le passage d'une longueur d'onde à une autre a pour conséquence la modification de l'accessibilité du glutamate ce qui active ou inactive le canal (suivant le site de fixation du MAG). Ce canal a ensuite été exprimé dans un neurone spinal de la larve du poisson zèbre pour mimer le mouvement de la nage suite à une stimulation lumineuse [331].

3.2.2 Le récepteur 5-HT_{3A}

Dans le cadre de la compréhension du mécanisme de couplage entre le domaine de liaison du ligand et le pore du récepteur ionotropique 5-HT_{3A}, des chimères entre la protéine AChBP (Acetylcholine Binding Protein) et le pore de 5-HT_{3A} [37] ont été élaborées. Lorsque trois boucles de l'AChBP sont remplacées par leurs équivalents

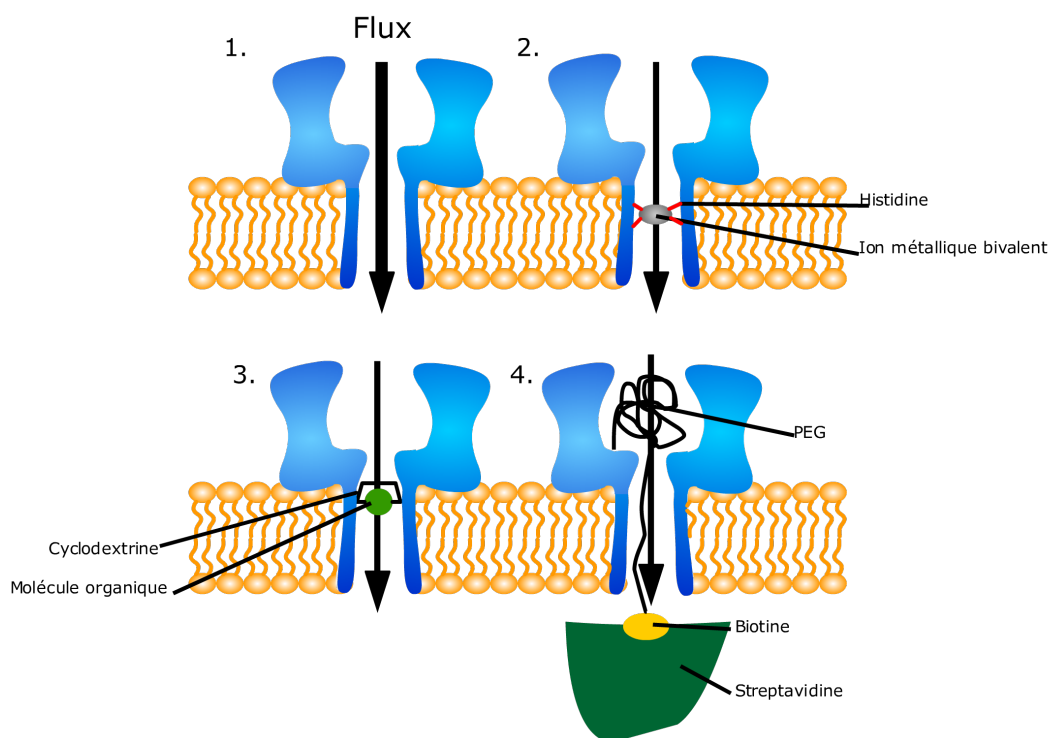


FIGURE 3.1 – Principe de l'utilisation de l'hémolysine modifiée en tant que bio-capteur. (1) Pore natif, il n'est pas modifié et le flux ionique peut transiter sans contrainte. (2) Une des sous-unités de l'hémolysine est mutée et présente quatre His qui remplissent la sphère de coordination des ions métalliques bivalents. Les ions ne sont plus libres de circuler, ce qui se traduit par une baisse du courant. (3) L'ajout, de manière non-covalente, d'une cyclodextrine au niveau du pore permet de capter des molécules organiques. (4) La liaison covalente d'une molécule de PEG au niveau du pore et la présence de la biotine à l'autre extrémité permet de détecter la streptavidine.

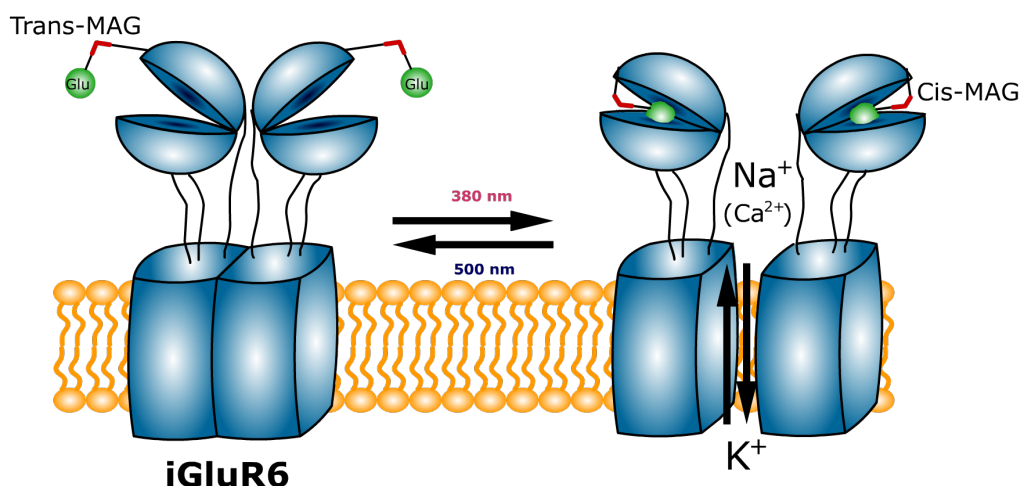


FIGURE 3.2 – Récepteur glutamate ionotrope activé par la lumière. Le glutamate est lié de manière covalente au domaine de liaison du ligand. L'azobenzène (en rouge) est un composé photoisomérisable. A 500 nm, il est en conformation *trans* et rend le ligand inaccessible. A 380 nm, le passage en conformation *cis* rend le ligand accessible au site de liaison [298]. Le canal peut alors s'ouvrir.

appartenant à 5-HT_{3A}, la liaison d'acétylcholine engendre la formation d'un courant. Cette approche a permis d'élucider les bases du mécanisme de couplage entre le domaine de liaison du ligand et le "gating" du canal. Ainsi, l'ingénierie protéique a abouti à l'élaboration d'un biocapteur hybride fonctionnel.

3.2.3 Ion Channel–Coupled Receptors

Les Ion Channel–Coupled Receptors (ICCR) reposent sur l'association covalente de l'extrémité C-ter d'un GPCR avec le N-ter de Kir6.2 [206]. Cette association est optimisée pour faire en sorte que la liaison d'un ligand au niveau du GPCR entraîne l'ouverture ou la fermeture du canal, ayant pour conséquence une modulation du courant mesuré (fig. 3.3). Ainsi, il a fallu supprimer 25 résidus en N-ter de Kir6.2 pour observer un couplage optimal entre les deux protéines. Deux ICCR ont été décrits jusqu'à lors : le premier basé sur le récepteur muscarinique M2 (M2–K0-25) et le second sur le récepteur dopaminergique D2 (D2–K0-25). La liaison d'acétylcholine sur M2–K0-25 provoque une augmentation du courant mesuré, traduisant une ouverture du canal. A l'inverse, la liaison de dopamine sur D2–K0-25 a pour effet une diminution du courant qui correspond à une fermeture du canal. Ces protéines de fusion pourraient être utilisées dans le cadre du criblage de médicaments mais pourraient également servir d'outil pour la compréhension du mécanisme d'ouverture/fermeture de Kir6.2.

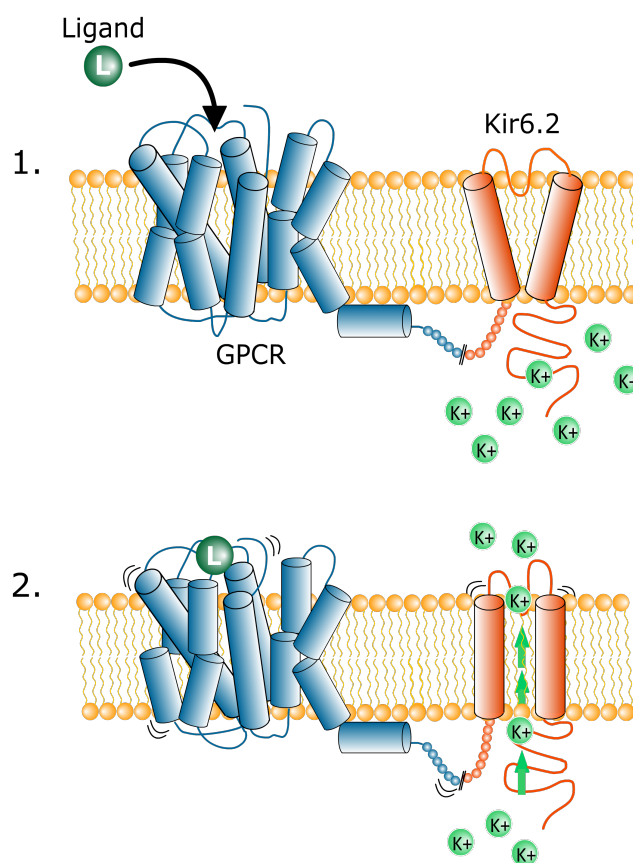


FIGURE 3.3 – Principe de fonctionnement des ICCR. Un ICCR est formé par l'association du C-ter d'un GPCR avec le N-ter de Kir6.2. (1) Le ligand se fixe sur le GPCR. (2) Les changements de conformation au niveau du récepteur sont transmis au canal qui s'ouvre, dans ce cas. Cela engendre alors un courant ionique facilement mesurable.

Deuxième partie

Matériel et Méthodes

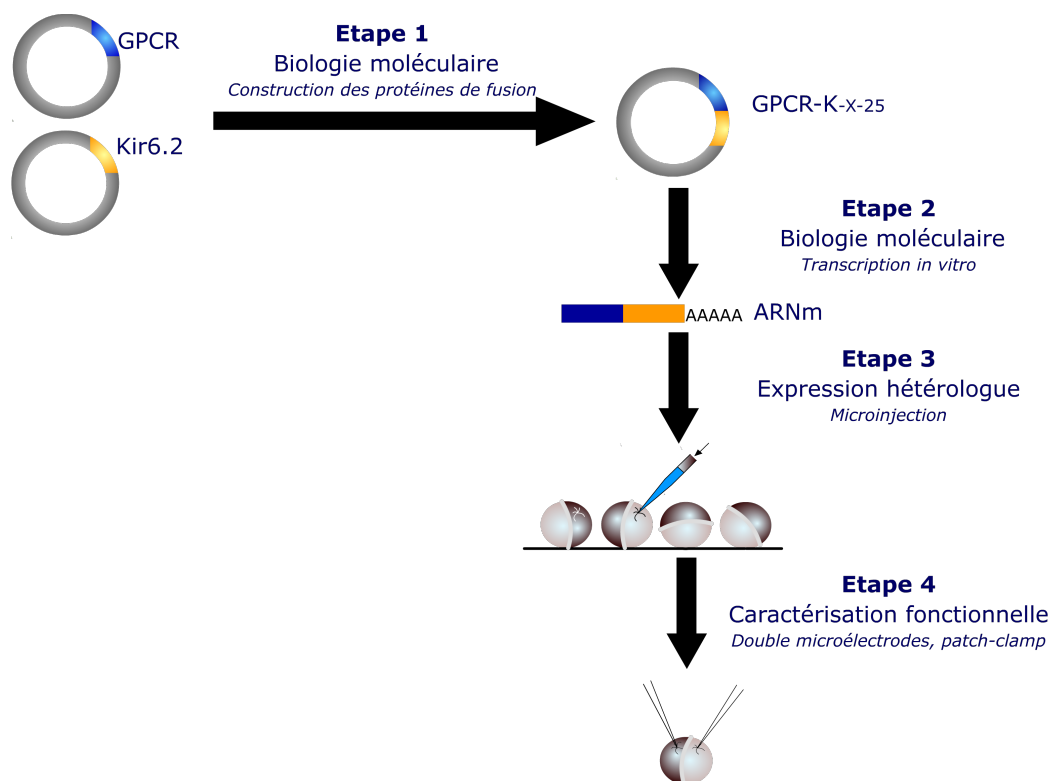


FIGURE 3.4 – Récapitulatif de l'ensemble des étapes mises en œuvre dans le cadre de cette étude.

Afin d'étudier nos biocapteurs (ICCR), nous devons, dans un premier temps, effectuer les fusions entre les GPCR et le canal Kir6.2 tronqué de 25 acides aminés en N-ter. Pour ce faire, nous utilisons des méthodes de biologie moléculaire adaptées à ce type de fusion. Une fois les ICCR obtenus, nous réalisons une transcription *in vitro* puis nous injectons l'ARNm ainsi obtenu dans les ovocytes de xénope. La caractérisation fonctionnelle est ensuite possible grâce à la mise en œuvre de techniques d'électrophysiologie. Ceci nous permet d'apprécier, entre autres, la qualité de la communication entre le GPCR et Kir6.2, l'affinité pour l'agoniste...

La partie suivante décrit en détail les méthodes utilisées, de la conception à la caractérisation des ICCR.

Chapitre 4

Biologie Moléculaire

4.1 Clones et Vecteurs d'Expression

Lors de nos expériences, nous avons utilisé le clone de SUR1 de hamster (ABCC8, Genbank accession number : L40623), fourni par le Dr J. Brian (Portland, Oregon, USA), le clone de SUR2A de rat (ABCC9, Genbank accession number : D83598) et le clone de Kir6.2 de souris (KCNJ11, Genbank accession number : D50581) qui nous ont été remis par le Dr S. Seino (Chiba University School of Medicine, Japan). Nous avons également fait usage des clones de TMD0-F195 de SUR1 de hamster ([46], [125]) et Kir6.2 Δ C36 de souris (Tucker, 1997). Les clones humains de CB1 (Genbank accession number : AF107262), CCR2b (Genbank accession number : NM_000648) et D3 (DRD3, Genbank accession number : NM_000796) nous ont été aimablement fournis par le Dr R. Wagner (Institut Gilbert Laustriat, Strasbourg, France). Le clone de β_2 humain (Genbank accession number : NM_000024.3) provient de la société Origene et le clone de l'opsine bovine (Genbank accession number : NM_001014890) nous a été gracieusement donné par le Dr O. Ernst.

Le vecteur d'expression dans lequel sont sous-clonées toutes nos constructions dérive du vecteur pGEMHE (fig.4.1) et nous a été fourni par le Dr D. Logothetis (Mount Sinai Hospital, New York). Ce plasmide est lui-même adapté du vecteur commercial pGEM3Z (Promega). Le plasmide actuellement utilisé est pGH2 qui fut créé au laboratoire par le Dr F. Pagès. Il possède une origine de réplication bactérienne (ORI), un gène de résistance à l'ampicilline codant pour la β -lactamase, qui permet de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide. De plus, il présente un promoteur de phage T7 permettant la transcription par l'ARN polymérase T7. Le site multiple de liaison (site de sous-clonage) est flanqué par les régions non transcrites (5'utr et 3'utr, utr pour untranslated region) de la globine de xénope qui augmentent le taux d'expression de la protéine d'intérêt. Ce plasmide possède une queue poly(A) en 3' de l'ADN codant pour la protéine d'intérêt. Ceci améliore le temps de demi-vie

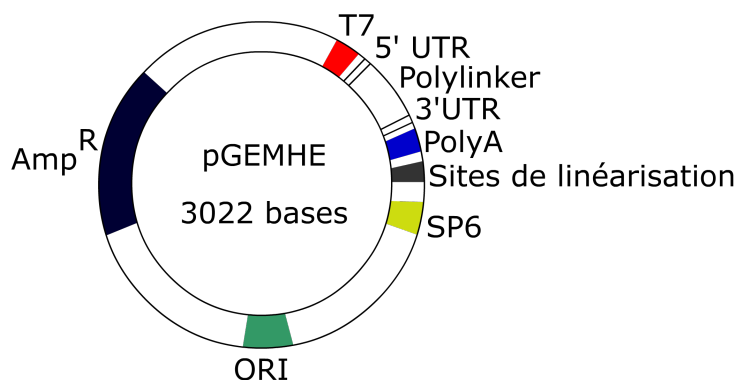


FIGURE 4.1 – Représentation schématique de pGEMHE, vecteur d'expression protéique adapté à l'ovocyte de xénope.

des ARN obtenus. Les sites de linéarisation permettent, comme leur nom l'indique, de linéariser l'ADN avant transcription. Ils sont constitués de sites de coupure pour des enzymes de restriction telles que NotI, NheI...

4.2 Construction des protéines de fusion et mutants

4.2.1 Sous-clonage par ligation

Lorsque nous recevons un clone dans un autre vecteur que pGH2, nous devons effectuer un sous-clonage. La méthode que nous avons utilisée est le sous-clonage par ligation. Il faut tout d'abord choisir une ou des enzymes de restriction coupant en amont et en aval du gène dans le vecteur d'origine et appartenant au polylinker de pGH2. Après digestion, les échantillons (pGH2 et le vecteur d'origine) sont déposés sur gel d'agarose 0,8% et purifiés (kit QIAquick gel extraction, QIAGEN). pGH2 coupé et le fragment correspondant au gène d'intérêt sont ensuite mis en présence d'une ligase (rapid ligation kit, Roche) afin d'introduire l'insert (*i.e.* le gène d'intérêt) dans le vecteur.

Sur ce principe, nous avons effectué le sous-clonage de β_2 avec l'enzyme de restriction EcoRI, le sous-clonage de CB1, CCR2b, D3 (à l'origine dans le vecteur pCR4_TOPO_Blunt) avec les enzymes BamHI, XbaI et BsmBI. L'opsine a également été sous-clonée du vecteur pMT4 au vecteur pGH2 suite à une coupure par EcoRI.

4.2.2 Mutagenèse dirigée

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le kit de mutagenèse dirigée Quik-Change (Stratagene) dont le principe est décrit dans la figure 4.2. Après avoir identifié

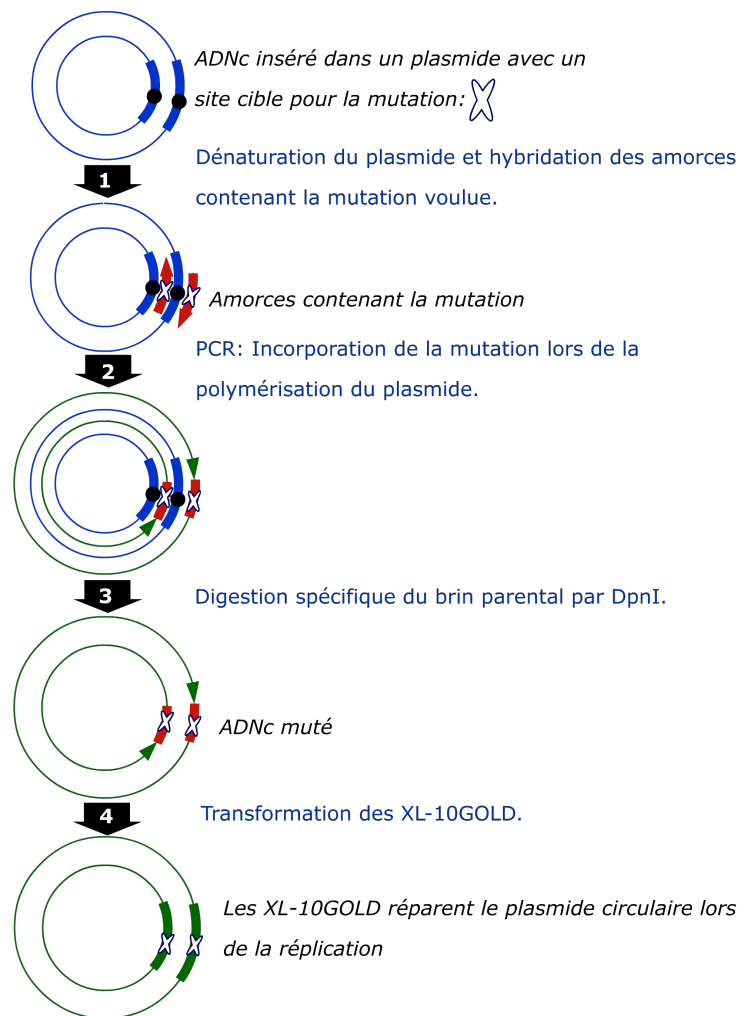


FIGURE 4.2 – Principe de la mutagenèse dirigée réalisée avec le kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).

la mutation à réaliser (délétion, insertion, substitution), nous élaborons des oligonucléotides ou amorces avec le logiciel VectorNTI (Invitrogen). Ces oligonucléotides contiennent la mutation voulue et sont synthétisés par la société MWG Operon. Le principe est basé sur la méthode de polymerase chain reaction (PCR) et fait intervenir une ADN polymérase haute fidélité (Pfu Turbo). Celle-ci synthétise le nouveau brin à partir de ces oligonucléotides en se servant de l'ADN matrice comme guide. Le plasmide muté est donc obtenu de cette manière. Le produit de PCR est ensuite digéré par DpnI permettant ainsi d'éliminer l'ADN parental méthylé ou hemi-méthylé. La dernière étape consiste à transformer cet ADN dans les bactéries XL-10GOLD fournies avec le kit.

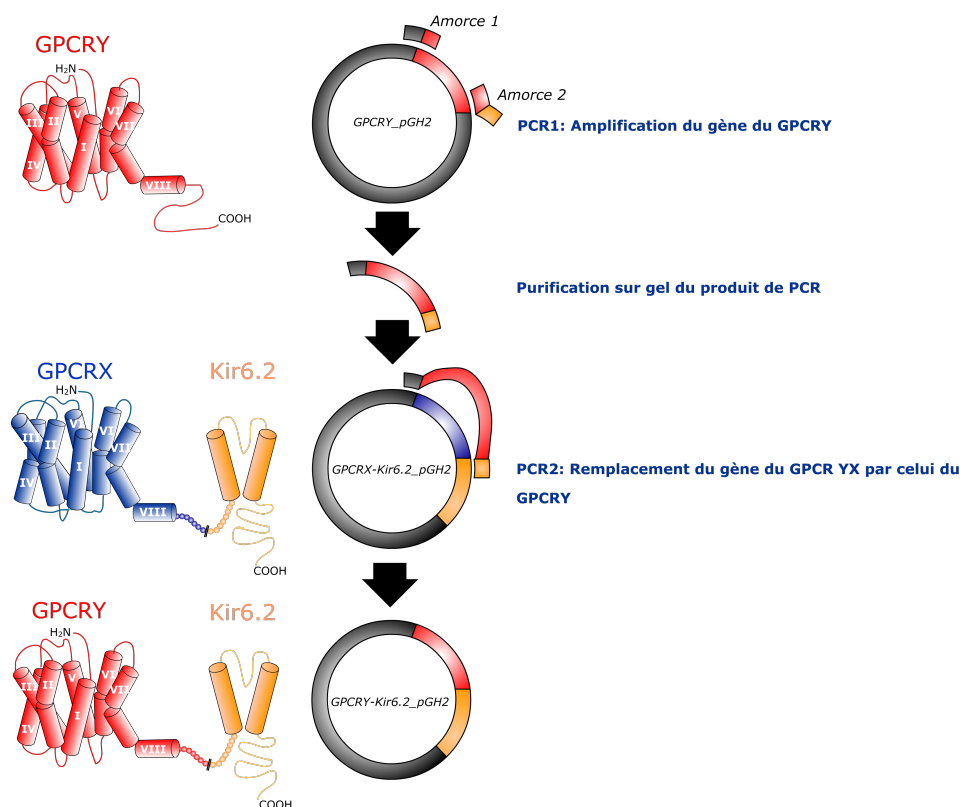


FIGURE 4.3 – Stratégie utilisée pour réaliser les fusions GPCR–Kir6.2 par PCR.

4.2.3 Fusions GPCR-Kir6.2

Afin de réaliser les fusions GPCR–Kir6.2, nous avons utilisé la construction M2– Δ N25Kir6.2 (Moreau et al., 2008) comme matrice et nous avons remplacé le M2 par les gènes de CB1, β_2 , CCR2, D3 et de l’opsine. Comme décrit en figure 4.3, nous devons effectuer deux étapes de PCR. Lors de la première, nous utilisons des oligonucléotides d’environ 50 pb s’hybridant, d’une part, avec pGH2 et le début du gène de GPCRY (amorce 1, fig. 4.3) et, d’autre part, avec la fin du gène de GPCRY et le début du gène de Δ N25Kir6.2 (amorce 2, fig. 4.3) afin d’amplifier le gène de GPCRY. Le produit de PCR est déposé sur gel d’agarose 0,8% et purifié avec le kit QIAquick Gel extraction (QIAGEN). L’ADN ainsi purifié sert d’amorce pour la seconde PCR au cours de laquelle le gène de GPCR_X (dans notre cas, M2) est remplacé par celui de GPCRY. Les réactifs utilisés proviennent du kit QuikChange. Le produit de PCR est ensuite digéré par DpnI et nous le transformons dans les bactéries XL-10GOLD (Stratagene). Les clones positifs sont sélectionnés suivant leur profil de restriction. Le codant est enfin séquencé par la société Cogenics.

	Température	Durée	
1.	95°C	5 min	Dénaturation initiale
2.	95°C	1 min	Dénaturation
3.	60–64°C*	1 min	Hybridation
4.	68°C	12 min	Elongation
5.	68°C	10 min	Elongation finale
6.	10°C	∞	Conservation

TABLE 4.1 – Cycles de PCR—Les étapes 2 à 4 sont répétées 35 fois—*La température d'hybridation varie suivant les PCR.

4.2.4 Délétion de grands fragments

Pour optimiser le couplage des ICCR, nous avons dû raccourcir la partie C-terminale de certains GPCR. Ainsi, nous avons utilisé des amorces s'hybridant avec des fragments flanquant la zone à déléter (fig. 4.4). De cette manière, l'ADN polymérase du kit QuikChange synthétise le nouveau brin à partir de ces amorces et aboutit à un plasmide contenant la forme tronquée du GPCR au sein de l'ADN de l'ICCR.

4.3 Amplification du matériel génétique

4.3.1 Transformation des bactéries compétentes

Après avoir effectué les manipulations d'ingénierie génétique, il est nécessaire de transférer l'ADN obtenu dans des bactéries afin de l'amplifier. Cette transformation nécessite l'utilisation de bactéries dites compétentes. Les bactéries utilisées dans nos expériences sont, d'une part, des XL-10GOLD (Stratagene) pour les produits de PCR et, d'autre part, les JM109 pour les sous-clonages. Pour incorporer l'ADN, nous l'ajoutons à 50 μL de bactéries compétentes et ce mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes. Nous soumettons ensuite les bactéries à un choc thermique pour les perméabiliser : 42 °C pendant 45 secondes puis 2 minutes dans la glace. Le plasmide comportant un gène de résistance à l'ampicilline, la sélection des bactéries l'ayant intégré est réalisée après étalement sur LB (Luria-Bertani) agar contenant cet antibiotique (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3.2 Purification de l'ADN plasmidique

Le principe de cette purification repose sur la méthode dite de lyse alcaline. Dans un premier temps, les cellules sont lysées (avec un détergent, le sodium dodécyl sulfate) et l'ADN plasmidique est séparé de l'ADN chromosomique par dénaturation en pH basique. Leur réappariement est provoqué par neutralisation du pH de la solution. L'ADN chromosomique étant de taille plus importante que le plasmidique,

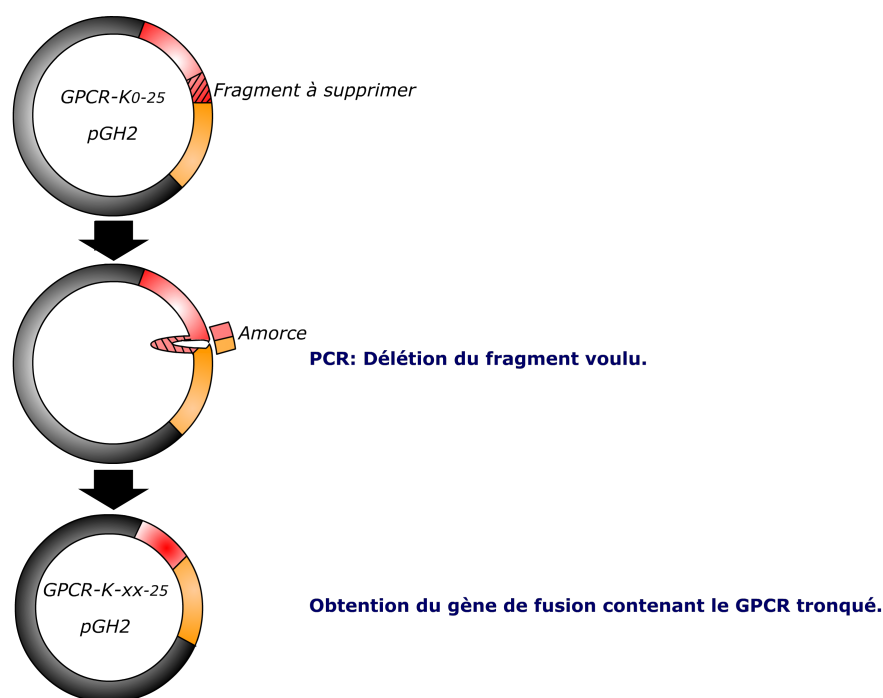


FIGURE 4.4 – Stratégie mise en œuvre pour supprimer de grands fragments par PCR.

celui-ci ne se réhybride pas et précipite. La séparation des débris bactériens (membrane plasmique, protéines, ADN chromosomique) et de l'ADN plasmidique s'effectue par centrifugation à 14000 tpm, 4 °C, 30 minutes ou par filtration. L'ADN est ensuite précipité et centrifugé en présence d'isopropanol puis d'éthanol 70%. Le culot d'ADN séché à l'air libre est enfin repris dans de l'eau autoclavée.

4.3.2.1 Miniprep

La miniprep permet de préparer rapidement suffisamment d'ADN pour tester un plasmide. Dans ce cas, nous partons de 4 mL de culture bactérienne en milieu LB supplémenté en ampicilline (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les tampons de resuspension, de lyse et de neutralisation sont ceux fournis par le kit QIAgen. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation. L'ADN est ensuite précipité avec de l'isopropanol puis lavé à l'éthanol 70%. La sélection des clones positifs se fait par digestion enzymatique et analyse des profils de restriction.

4.3.2.2 Midiprep

La midiprep (kit QIAgen) permet d'obtenir un ADN de pureté plus élevée que la miniprep car, suite à l'étape de lyse et de neutralisation, les échantillons sont passés sur un filtre, pour éliminer les débris bactériens, puis sur une colonne échangeuse

d'anions. De plus, comme nous partons d'une culture bactérienne de 50 mL en milieu LB+ampicilline, la quantité d'ADN est plus importante que dans le cas d'une miniprep. De par sa pureté, ce type de préparation est adapté à la transcription *in vitro*.

4.4 Séquençage

La technique de séquençage appliquée par la société Beckman Coulter Genomics repose sur la méthode de Sanger. Elle consiste à amorcer la synthèse de l'ADN à séquencer à partir d'un oligonucléotide d'une vingtaine de paires de bases suivant la technique de PCR. Quatre réactions sont lancées simultanément, chacune faisant intervenir quatre desoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) et une quantité plus faible d'un didesoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP) marqué par une sonde fluorescente. Les ddNTP ont pour propriété de stopper la synthèse du nouveau brin. De cette manière, après migration des produits de PCR sur capillaires, il est possible, grâce à la présence de la sonde fluorescente, d'identifier différents intermédiaires de réaction résultant de l'incorporation d'un ddNTP. Suivant la taille de ces fragments, il est possible de reconstituer la séquence de l'ADN d'intérêt.

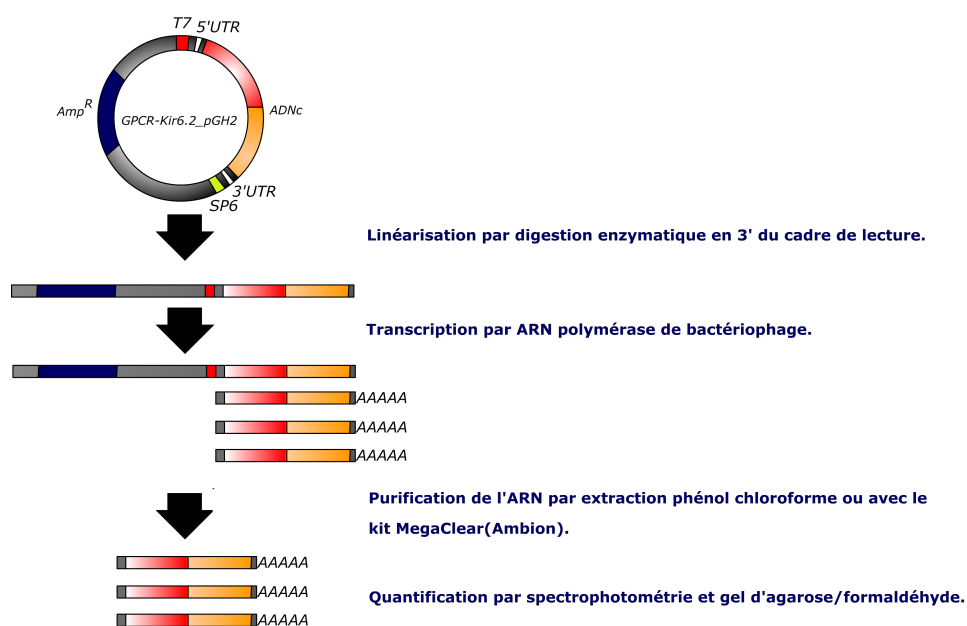
4.5 Transcription *in vitro*

Pour pouvoir exprimer les ICCR dans l'ovocyte de xénope, il faut transcrire l'ADNc en ARNm. Pour effectuer cette manipulation, il faut travailler dans des conditions se rapprochant le plus possible de conditions "RNase-free". Pour cela, il est nécessaire de porter des gants pendant toute la durée de la transcription. La préparation des mélanges de transcription s'effectue sous une hotte aspirante. Nous utilisons des Pipetman, des boîtes de cônes et de tubes dédiés à la manipulation d'ARNm. La paillasse est préalablement nettoyée avec le spray RNaseZap (Sigma-Aldrich). L'eau utilisée est de l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) 0,05% pendant la nuit puis autoclavée pendant 20 min à 121 °C. Le DEPC a pour propriété d'inactiver les RNases.

Les différentes étapes de la transcription *in vitro* sont décrites dans la figure 4.5. Tout d'abord, le plasmide contenant l'ADNc à transcrire doit être linéarisé. Pour ce faire, nous utilisons une enzyme dont le site de restriction est unique (NotI, NheI . . .) et situé en aval de la séquence 3'utr. Vingt unités d'enzyme sont ajoutées pour 10 μ g d'ADN et nous incubons le milieu réactionnel à 37 °C sur la nuit. Afin d'éliminer toute protéine (dont les RNases), nous effectuons une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique de l'ADN linéarisé. L'ADN ainsi purifié est déposé sur gel d'agarose 0,8% et la quantité à ajouter au milieu de transcription est déterminée suivant l'intensité

ARNm	Concentrations($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
ICCR	0,26
GPCR	0,12
TMDO	0,06
Kir3.4 S143T	0,12
Kir6.2 Δ C36	0,12
SUR	0,36

TABLE 4.2 – Concentrations des ARNm utilisés.

FIGURE 4.5 – Principe de la transcription *in vitro* avec le kit mMessage Transcription Machine T7 (Ambion).

de la bande. La transcription est faite par l'ARN polymérase T7 en présence des réactifs du kit mMessage mMachine (Ambion). Le kit permet d'obtenir une quantité importante d'ARNm, celui-ci possédant une coiffe de guanosine méthylée en 5' le protégeant contre les RNases 5'–3' et permettant d'initier la traduction. Après 4 heures de transcription, l'ARNm est purifié soit par extraction phénol/chloroforme soit avec le kit MegaClear (Ambion). L'ARNm est par la suite dosé par spectrophotométrie et par gel d'agarose en conditions dénaturantes (formaldéhyde) avec un marqueur de concentration. Les ARNm sont enfin dilués aux concentrations indiquées dans le tableau 4.2 et conservés à -80°C .

Chapitre 5

Expression Hétérologue

5.1 L'ovocyte de xénope comme outil d'expression hétérologue

L'ovocyte de xénope (*Xenopus laevis*, fig. 5.1) est une cellule reproductrice qui mesure entre 1 et 1,3 mm de diamètre. Cette propriété en fait une cellule facile à manipuler et à microinjecter. Au cours de l'ovogenèse, qui peut être décomposée en 6 stades, l'ovocyte accumule des réserves énergétiques et informatives. Ainsi, il possède tout ce qui est nécessaire à la traduction d'ARNm exogènes (enzymes, ribosomes, protéines de la traduction) et a une densité de canaux endogènes assez faible. Toutes ces caractéristiques en font un outil idéal d'étude des canaux ioniques. Il est utilisé dans ce domaine depuis plusieurs dizaines d'années [27, 64, 283, 276, 322].

Il faut cependant garder à l'esprit que, comme pour tout système d'expression (cellules de mammifères, bactéries ...), les réponses peuvent être influencées par la différence de composition de la membrane plasmique ou encore par les voies de signalisations intracellulaires propres à l'ovocyte de xénope.

L'ovocyte de xénope est constitué de deux hémisphères : le pôle animal, qui



FIGURE 5.1 – *Xenopus laevis*

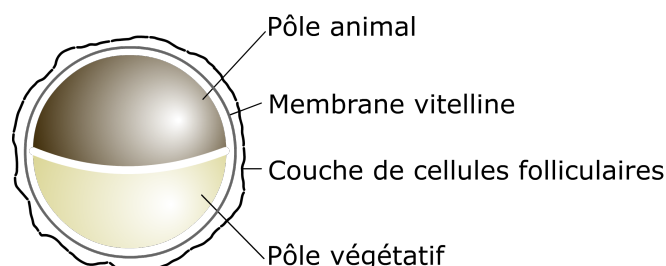


FIGURE 5.2 – Représentation d'un ovocyte de xénope au stade V ou VI.

contient le noyau, et le pôle végétatif (fig. 5.2). Leur extraction se fait sous forme de lobes ovariens, qui sont constitués d'ovocytes, de vaisseaux sanguins, de tissu conjonctif et de cellules folliculaires. Ces dernières communiquent électriquement entre elles et avec les ovocytes grâce à la présence de jonctions communicantes ("gap junction"). Il est donc impératif de s'en débarrasser en effectuant une digestion par la collagénase. L'ovocyte est de plus recouvert par une matrice de glycoprotéines, la membrane vitelline, qui lui permet d'arborer une forme sphérique. Les mailles formées par cette matrice sont suffisamment larges pour permettre l'interaction de petites molécules avec la surface de l'ovocyte. Lors d'une expérience de patch-clamp, il est nécessaire d'éliminer cette membrane pour avoir un accès direct à la membrane plasmique. L'ovocyte est alors extrêmement fragile et sa manipulation demande la plus grande attention.

5.2 Extraction et préparation des ovocytes

Les xénopes proviennent soit du Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire de Montpellier (CNRS), soit du Centre de Ressources Biologiques de Rennes. Elles sont élevées dans des bacs, dans une pièce dont la température est maintenue à 22 °C et dans laquelle un cycle 12h jour/12h nuit est imposé. Les xénopes sont nourries au plus 3 fois par semaine : 1 fois avec du cœur de bœuf et le reste du temps avec des vers de farine.

Afin d'extraire les ovocytes de xénope, nous anesthésions au préalable une xénope avec une solution à 1 g.L⁻¹ d'acide aminobenzoïque ethyl ester (Sigma-Aldrich). Après 20 min d'anesthésie, la xénope est déposée sur un lit de glace afin de la maintenir endormie. Son abdomen est séché puis une incision d'environ 1 cm y est pratiquée. Le muscle est ensuite également incisé pour permettre l'accès aux lobes ovariens. Une quantité d'ovocyte est ainsi retirée suivant les besoins. Ces deux incisions sont recousues avec du fil de suture resorbable (5-0, pointe de 16 mm 3/8c, 75 cm, Ethicon VICRYL). La xénope est rincée puis déposée dans un bac de réveil, la

ARNm	Quantité par ovocyte(ng)
ICCR	4,3
TMDO	1
Kir3.4 S143T	0,5
Kir6.2 Δ C36	2
SUR	6

TABLE 5.1 – Quantité d’ARNm injectée pour chaque construction, par ovocyte.

tête hors de l’eau pour écarter tout risque de noyade. Environ 3 heures plus tard la xénope est transférée dans le bac post-opératoire.

Par la suite, les ovocytes sont traités par une solution de collagénase (Sigma–Aldrich) à 20 mg.mL^{-1} (dans la solution A : NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2,4 mM, Hepes 16 mM, MgSO_4 0,82 mM, pH 7,4). Trois bains de 40 min environ se succèdent alors. Les ovocytes sont ensuite rincés au moins six fois avec la solution A et au moins six fois avec la solution isotonique A+B (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2,4 mM, Hepes 16 mM, MgSO_4 0,82 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,3 mM, CaCl_2 0,41 mM, pH 7,4). Les ovocytes sont conservés et triés dans cette même solution supplémentée en antibiotiques (pénicilline 1000 U.mL^{-1} , streptomycine 10 mg.mL^{-1} , gentamycine $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$). Lors de cette étape de tri, les ovocytes sont sélectionnés sur des critères visuels (stade V ou VI, homogénéité de la coloration du pôle animal ...).

5.3 Microinjection des ARNm

L’étape de microinjection est effectuée le lendemain, après élimination des ovocytes n’ayant pas survécu. Nous préparons au préalable les pipettes de microinjections. Celles-ci sont obtenues à partir de microcapillaires de verre (3,5” Drummond # 3-000—203-G/X) étirés avec une étireuse horizontale (Micropipette puller P-97, Sutter Instruments and Co). Leur pointe est ensuite cassée pour atteindre une taille d’environ $15 \mu\text{m}$ de diamètre. Les pipettes sont remplies avec de l’huile minérale incompressible (Sigma Aldrich) puis placées sur le piston de l’injecteur (Nanoject, Drummond). Par la suite, $3 \mu\text{L}$ de la solution d’ARN à injecter sont aspirés dans la micropipette. Les ovocytes sont placés sur une grille disposée dans une boîte de Pétri contenant la solution A+B+antibiotiques. Chaque ovocyte est piqué avec la micropipette puis 50 nL y sont injectés. Entre 40 et 50 ovocytes par construction sont ainsi obtenus. Les quantités d’ARN injectées pour chaque construction sont indiquées dans le tableau 5.1. Nous transférons ensuite les ovocytes dans des plaques 96 puits remplies avec de la solution A+B+antibiotiques, à raison d’un par puits. Ils sont enfin incubés pendant 2 à 5 jours à 19°C pour permettre l’expression.

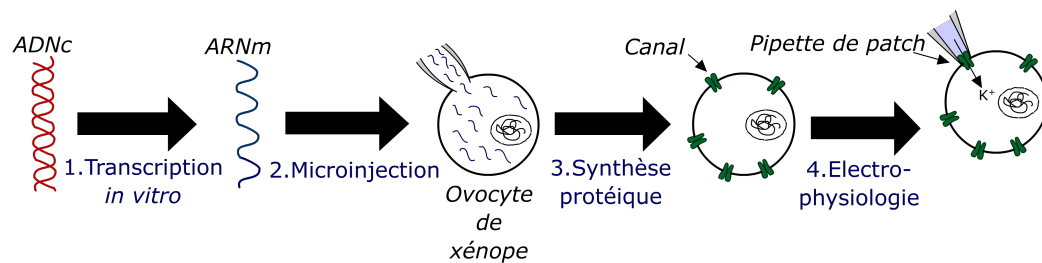


FIGURE 5.3 – Différentes étapes de l’expression de canaux ioniques dans l’ovocyte de xénope. (1) L’ADNc codant pour les constructions à étudier est transcrit. (2) L’ARNm obtenu après purification est injecté dans les ovocytes de xénope. (3) Deux à cinq jours à 19 °C sont nécessaires pour assurer la synthèse des protéines. (4) Les constructions sont caractérisées par des méthodes d’électrophysiologie (patch-clamp, double micro-électrodes).

Chapitre 6

Caractérisation Fonctionnelle

6.1 Patch-clamp

6.1.1 Principe

Les ions sont véhiculés à travers les membranes biologiques de manière spécifique par des pores protéiques transmembranaires que sont les canaux ioniques. Malgré l'existence de plusieurs états conformationnels distincts, on considère, dans une optique de simplification, que les canaux existent soit à l'état "ouvert", soit à l'état "fermé". Ceci correspond au passage, ou non, des ions à travers la membrane. Le sens et l'intensité de ces flux ioniques dépendent, d'une part de la force de perméation qui découle de la force de diffusion et, d'autre part, de la force électromotrice qui dépend de la valeur du potentiel de membrane. Ces mouvements d'ions à travers la membrane se traduisent en courants facilement mesurables expérimentalement par, entre autres, la technique du patch-clamp.

Cette technique permet de mesurer les variations de courant provoquées par les flux ioniques au travers des canaux. Elle fut mise au point en 1976 par Neher et Sakman dans le cadre de l'étude des canaux nicotiques ([214] ; prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1991, [108]). Grâce à cette technique, et suivant la configuration utilisée (fig. 6.1), il est devenu possible d'observer l'activité d'un seul canal ou de la totalité des canaux d'une cellule. Pour ce faire, une micropipette de verre est positionnée sur la membrane plasmique d'une cellule, de façon à former un contact étroit ("seal"), dans le but d'en isoler un morceau ("patch") et une valeur constante de potentiel est imposée à la membrane ("voltage-clamp"). Pour annuler la différence entre le potentiel de membrane (V_m) et le potentiel fixé par l'expérimentateur (V_i), l'amplificateur injecte un courant par l'intermédiaire d'une résistance à contre-réaction (R_c). Les courants ainsi obtenus varient de quelques pico-Ampères (pA), pour un seul canal, à quelques nanoampères (nA) ou microampères (μA) pour une cellule entière.

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans la régulation du passage d'une espèce ionique à travers les canaux :

- **Le potentiel d'équilibre de l'ion, E_{ion}** , qui dépend de sa concentration de part et d'autre de la membrane et étant déterminé par l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln\left(\frac{[ion]_e}{[ion]_i}\right)$$

où $R=8,315 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (constante des gaz parfaits), T = température absolue, z =valence de l'ion et $F=96489 \text{ C.mol}^{-1}$ (la constante de Faraday).

- **Le potentiel membranaire, V_m** .
- **La conductance des canaux, G** , correspondant à l'aisance avec laquelle les ions traversent les canaux (notée "g" lorsqu'il s'agit de la conductance d'un seul canal).

Le courant peut être calculé à partir de la loi d'Ohm ($U = RI$) suivant la formule suivante :

$$I = G \cdot (V_m - E_{ion})$$

avec $U = (V_m - E_{ion})$ et $G = \frac{1}{R}$.

Il est possible de fixer certaines de ces variables, notamment V_m (mode "voltage-clamp") ou encore le potentiel d'équilibre de l'ion qui peut-être annulé en établissant des concentrations équimolaires de part et d'autre de la membrane. La mesure du courant (I) apporte des renseignements quant à la conductance qui représente une propriété spécifique du canal étudié.

6.1.2 configurations utilisées en patch-clamp

Il existe plusieurs configurations d'enregistrement en patch-clamp (fig.6.1) :

- **Cellule attachée** : La pipette est placée sur la membrane de la cellule. Afin de créer un contact étroit entre le verre de la pipette et la surface de la cellule, une légère dépression est exercée, souvent par succion, à l'intérieur de la pipette. Ainsi, la résistance entre la pipette et la membrane se trouve être de l'ordre de plusieurs giga Ω . Dans cette configuration, le courant mesuré correspond à celui engendré par les canaux situés sous la pipette. Cette technique est particulièrement adaptée pour observer la régulation de l'activité des canaux ioniques en conditions physiologiques. En effet, le milieu intracellulaire étant conservé, cela permet d'étudier des phénomènes de régulation provoqués par des messagers intracellulaires.
- **Cellule entière** : L'application d'une dépression plus importante ou d'un voltage élevé permettent de rompre la membrane et d'avoir accès au milieu intracellulaire. En effet, une fois la rupture de la membrane effectuée, le cytosol

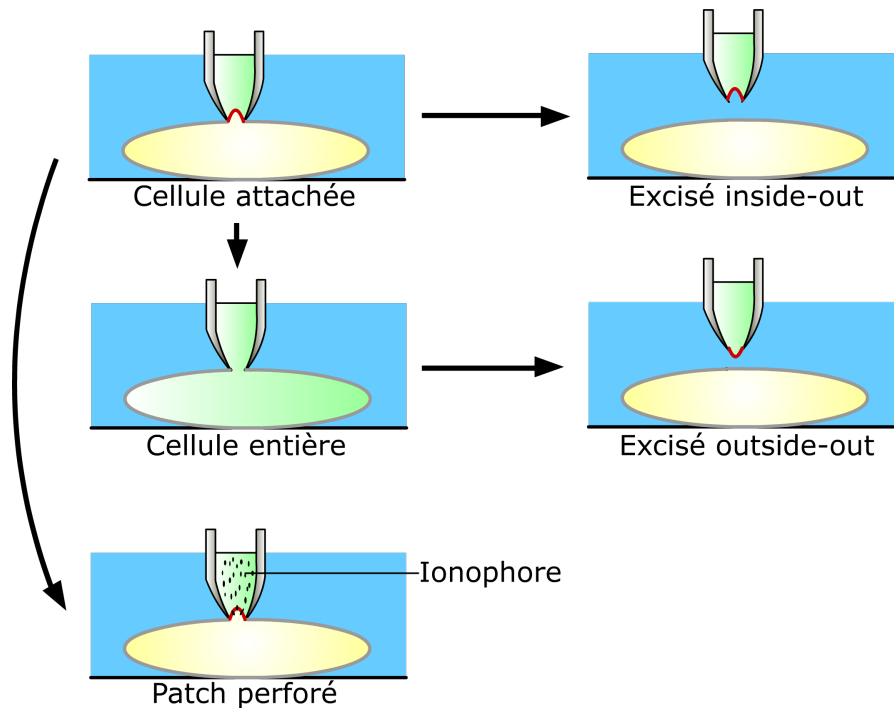


FIGURE 6.1 – Configurations utilisées en patch-clamp.

diffuse dans le milieu intrapipette. Dans cette configuration, le courant mesuré est celui traversant la totalité des canaux présents à la membrane et est donc macroscopique. Afin de remédier au problème de l'altération du milieu cytoplasmique, la configuration membrane perforée a été établie. Elle permet, suite à l'ajout d'un ionophore (ex : nystatine) dans le milieu intrapipette, de modifier la composition du milieu intracellulaire. Cela assure la conservation d'une certaine intégrité du milieu intracellulaire.

- **Excisé outside-out** : Cette configuration est obtenue à partir de celle de cellule entière. Le morceau de membrane est retiré par éloignement de la pipette et les deux extrémités de membrane se réassemblent, exposant ainsi la face extracellulaire vers l'extérieur. Il est ainsi possible d'étudier l'effet de composés appartenant à l'environnement (ligands extracellulaires) sur les canaux présents dans le morceau de membrane.
- **Excisé inside-out** : Cette configuration résulte de l'éloignement de la pipette suite à l'obtention de celle de cellule attachée. Contrairement à l'excisé outside-out, c'est la face intracellulaire qui se retrouve exposée vers l'extérieur. Cette configuration est indiquée dans le cas de l'étude de canaux régulés par des agents intracellulaires (ex : ATP).

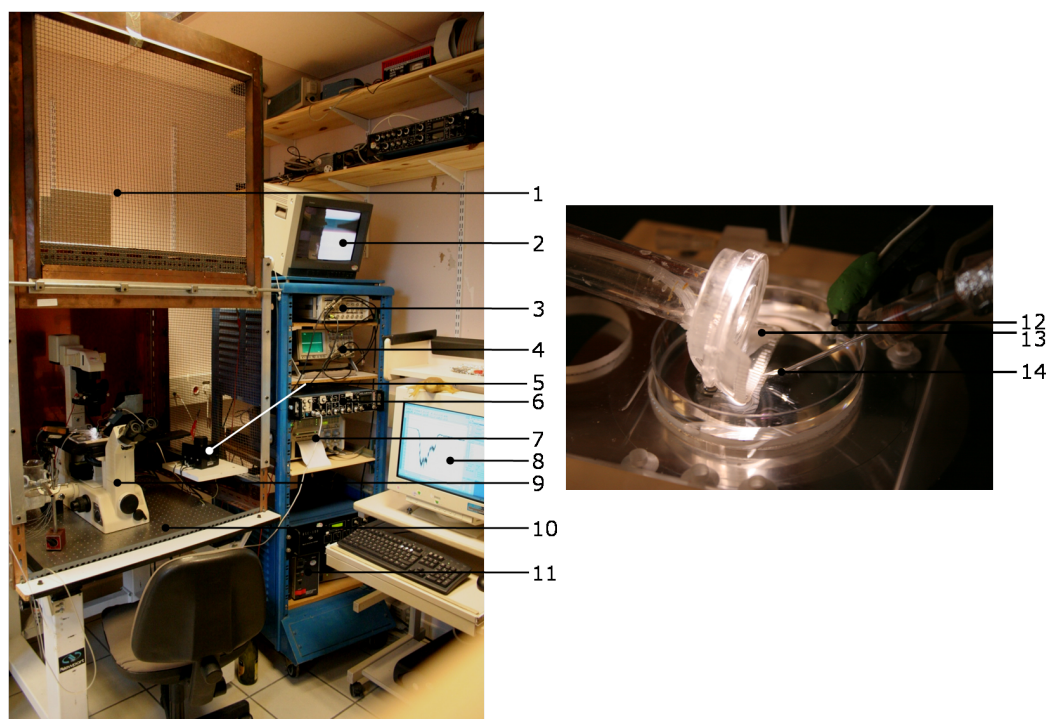


FIGURE 6.2 – Poste de patch-clamp.

6.1.3 Description du poste de patch-clamp

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le poste de patch-clamp suivant (fig. 6.2) : La cage de Faraday (1) assure une protection de la zone d'expérimentation contre les interférences électromagnétiques. L'ensemble du dispositif est placé sur une table anti-vibrations (10) mécaniques sur coussin d'air (azote) afin de réduire au maximum les vibrations pouvant nuire à la formation du "seal". Un moniteur vidéo (2) relié directement au microscope inversé (9) (objectifs X4, X10, X40) permet de surveiller à distance la position de la micropipette (14), de l'ovocyte et de la tête de perfusion (13, reliée aux seringues contenant les solutions à tester). Afin de déplacer la micropipette de manière précise et dans les trois dimensions, nous utilisons un micromanipulateur électrique trois axes (5). L'électrode de référence est placée directement dans le bain. Lors de l'enregistrement, le convertisseur de signal numérique/analogique, analogique/numérique (3) assure la communication bidirectionnelle entre le poste de patch-clamp et l'ordinateur (8). L'oscilloscope (4), en plus du logiciel pClamp9.0 permet suivre en temps réel l'évolution du courant mesuré. L'amplificateur de patch-clamp (6), quant à lui, est idéal pour mesurer des courants de l'ordre du pA et effectue la conversion courant-tension (convertisseur de résistance 10 G Ω , gain de 10 mV/pA et 100 M Ω , gain de 0,1 mV/pA). Il impose également le potentiel au morceau de membrane via la micropipette. L'enregistreur

	Description
1	Cage de Faraday
2	Moniteur vidéo
3	Digidata 1322A
4	Oscilloscope (HM-407, Hameg)
5	Micromanipulateur électrique 3 axes (Burleigh PCS-5000 series)
6	Amplificateur (RK-300, Bio-Logic)
7	Enregistreur papier (RS-3200, Gould)
8	Ordinateur
9	Microscope inversé (Olympus, ULWCD 0.30)
10	Table anti-vibrations
11	Contrôleur système de perfusion (RSC-100, Bio-Logic)
12	Electrode de référence
13	Tête de perfusion rotative
14	Micropipette

TABLE 6.1 – Tableau résumant les différents composants du poste de patch-clamp.

papier (7) fournit une trace papier de l'enregistrement. Le mouvement de la tête de perfusion (13) est commandé par le contrôleur système de perfusion (11) qui est sous le contrôle du logiciel Perf2.10 (développé par M. Vivaudou). La micropipette (14), après avoir été remplie d'une solution d'électrolytes, est placée sur l'électrode d'argent. Elle est ensuite amenée au voisinage de la membrane de l'ovocyte et approchée délicatement jusqu'au contact des deux. La formation du scellement ("seal") est obtenue en réalisant une dépression dans la pipette par aspiration. Une fois le "seal" établi, le morceau de membrane se trouvant dans la pipette est isolé, tant physiquement qu'électriquement (résistance de l'ordre du $G\Omega$). Le potentiel est alors imposé par l'intermédiaire de l'électrode d'argent qui est reliée au dispositif de stimulation/détection/amplification.

6.1.4 Conditions expérimentales

6.1.4.1 Préparation des ovocytes

Suite à la microinjection, les ovocytes sont incubés de 48 à 96 heures à 19 °C dans le but d'obtenir une bonne expression des canaux ioniques à la membrane plasmique. Etant donné que la membrane vitelline entourant l'ovocyte limite l'accès à la membrane plasmique, il est nécessaire de l'éliminer, et ce, mécaniquement (fig.6.4). Cette opération est effectuée sous une loupe binoculaire et l'ovocyte est placé dans une solution hyperosmotique ("shrinking solution" : solution A + 100 mM NaCl) afin de provoquer le rétrécissement de l'ovocyte et la séparation du vitellus. La membrane vitelline est alors retirée à l'aide de pinces. Cette manipulation doit être effectuée extemporanément car elle rend l'ovocyte extrêmement sensible et diminue sa durée

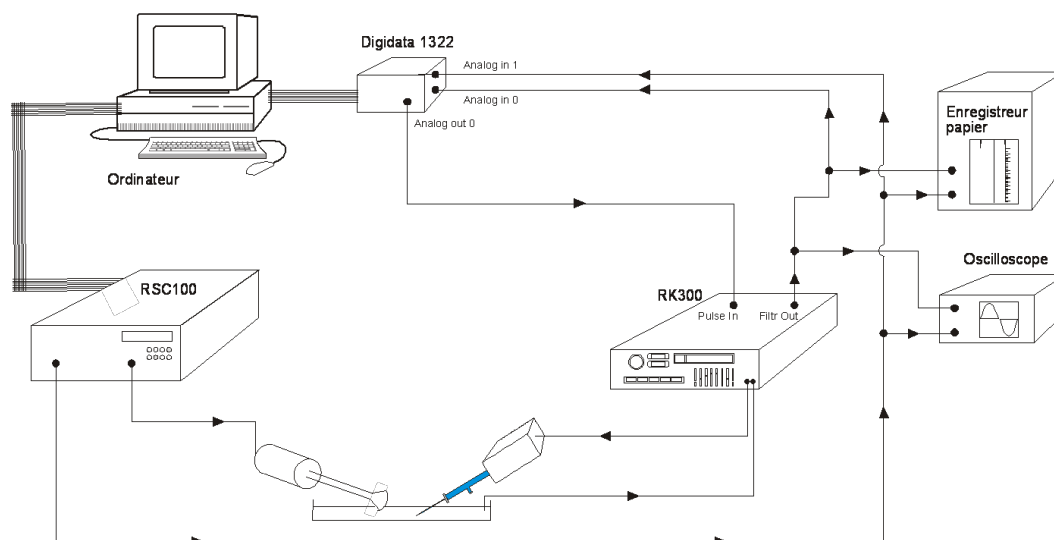


FIGURE 6.3 – Schéma représentant les connexions entre les différents composants du poste de patch-clamp

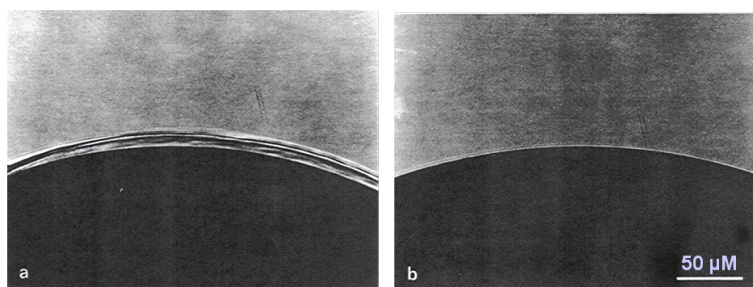


FIGURE 6.4 – Ovocyte avec sa membrane vitelline (à gauche). Ovocyte débarrassé de sa membrane vitelline (à droite)

de vie (1 à 2 heures maximum).

6.1.4.2 Micropipettes de mesure et solutions

Les micropipettes sont obtenues à partir de capillaires en borosilicate (Kimble glass Inc.). L'étirage s'effectue en deux étapes, avec une étireuse horizontale (P97 Micropipette Puller, Sutter Instruments Co.). Dans un premier temps, le capillaire est étiré de manière modérée et chauffé pour réduire son diamètre à quelques centaines de μm . La seconde étape a pour résultat la rupture du capillaire et la formation de micropipettes ayant une pointe de diamètre avoisinant le μm . Les micropipettes sont ensuite remplies avec une solution isotonique par rapport au milieu intracellulaire (150 mM K^+ , 5 mM Mg^{2+} , 140 mM Cl^- , 10 mM Pipes, fig. 6.5) puis placées sur l'électrode d'argent chloruré.

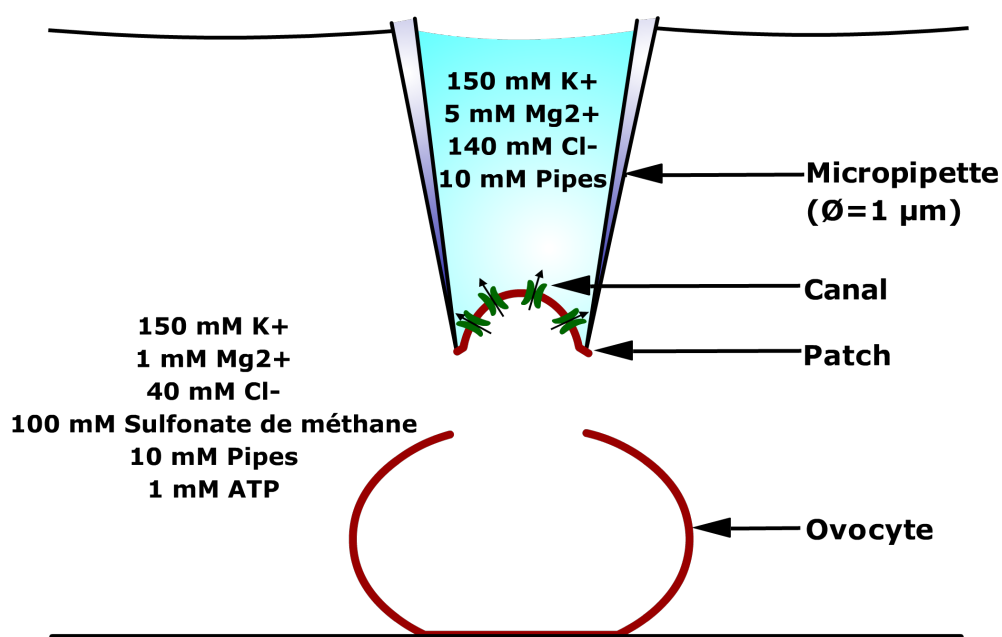
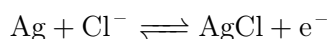


FIGURE 6.5 – Dispositif expérimental et solutions mis en œuvre dans le cadre de la mesure de courants potassiques en patch-clamp.

La concentration en potassium intrapipette est fixée à 150 mM afin d'obtenir des concentrations équivalentes de part et d'autre du morceau de membrane. Ceci a pour effet d'annuler le potentiel d'inversion du potassium (E_K). L'électrode d'argent chloruré a pour rôle de convertir les courants d'ions en courant d'électrons, en évitant les problèmes de polarisation, suivant la réaction suivante :



Cette conversion est obligatoire pour permettre à l'appareillage de mesurer les résultats.

6.1.4.3 Formation d'un patch et mesures de courants

Afin d'obtenir un patch de membrane, il faut tout d'abord placer délicatement la micropipette près de l'ovocyte. L'application d'une légère surpression à l'intérieur de la pipette évite l'entrée de poussières ou de débris se trouvant dans le bain. Lorsque la pipette est en contact avec la surface de l'ovocyte, une dépression est exercée dans la pipette par aspiration continue. De cette manière, le morceau de membrane commence à adhérer aux parois de la micropipette jusqu'à obtention d'une interaction quasi-covalente entre les deux. La résistance du scellement ("seal") atteint alors les environs du giga Ω , il s'agit d'un "gigaseal". Le morceau de membrane est excisé en retirant rapidement la micropipette de la surface de l'ovocyte. Il est ensuite possible de tester différents composés grâce au système de perfusion (fig. 6.6).

Etant donné l'absence de cations autres que K^+ , les seuls courants endogènes pouvant être mesurés sont ceux engendrés par les canaux chlores activés par le calcium ($I_{Cl(Ca)}$). L'ajout d'EGTA (chélateur de Ca^{2+}) dans les solutions assure l'inhibition de ces canaux. Les conditions expérimentales ainsi fixées permettent de restreindre les courants enregistrés à ceux résultant des flux potassiques de part et d'autre de la membrane.

Le courant potassique (I_K) engendré par les flux d'ions potassium circulant à travers les canaux ioniques contenus dans le patch est égal à :

$$I_K = G_K \cdot (V_m - E_K)$$

Cette équation correspond à la transposition de la loi d'Ohm au gradient électrochimique ($V_m - E_K$) où V_m est le potentiel de membrane ($V_m = -50mV$) et E_K le potentiel d'inversion de K^+ (dans nos conditions, $E_K = 0$). Dans ce cas, I_K dépend uniquement de G_K , c'est-à-dire de la conductance transmembranaire du potassium. De plus, G_K peut-être calculée à partir de la formule suivante :

$$G_K = P_o \cdot N \cdot g_K$$

où :

- P_o est la probabilité d'ouverture des canaux.
- N est le nombre de canaux présents dans le morceau de membrane.
- g_K est la conductance unitaire de chaque canal (entre 35 et 70 pS pour le canal K_{ATP}).

Ainsi, il est aisé de déterminer, grâce à la mesure du courant, le nombre de canaux présents dans le patch et leur activité (ouverture/fermeture).

Le potentiel de membrane étant fixé à -50 mV et l' E_K à 0, un flux d'ion traversant les canaux se traduit par une déflexion du signal enregistré (courant négatif et par convention entrant, fig. 6.7).

6.1.5 Traitements des données

Un convertisseur analogique-numérique (Digidata 1332) assure la conversion des signaux analogiques, provenant de l'amplificateur RK-300 (Bio-Logic) et du RSC-100, en signaux numériques pouvant être alors pris en charge par l'ordinateur (fig. 6.3). Ces signaux comprennent les variations de courant et les changements de perfusion correspondants. L'échantillonnage s'effectue ainsi à 1 KHz. Le logiciel Erwin 3.2 (développé par M. Vivaudou au laboratoire) permet de traiter les données obtenues. Tout d'abord, suivant l'amplitude des courants mesurés, les enregistrements sont filtrés entre 10 et 300 Hz (tab. 6.2). Il faut ensuite effectuer la correction de la

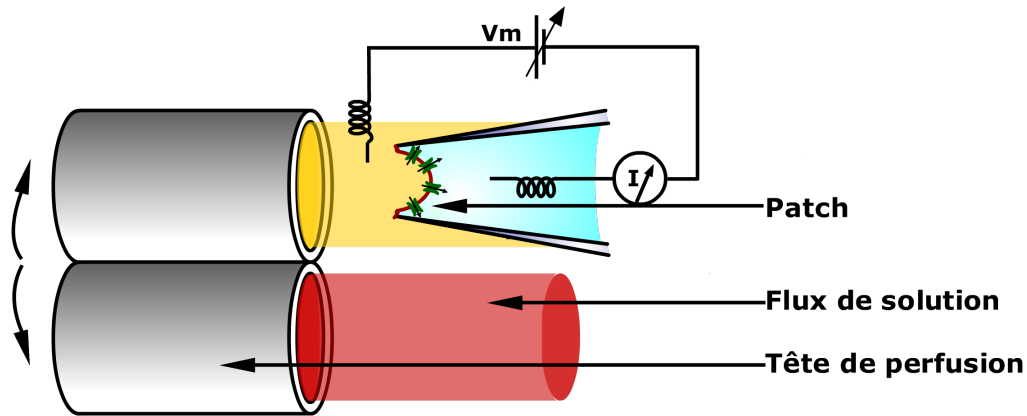


FIGURE 6.6 – Dispositif de perfusion utilisé pour le patch-clamp.

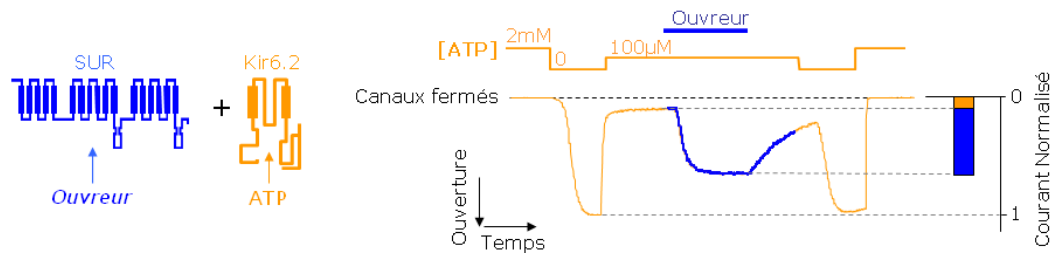


FIGURE 6.7 – Trace représentative obtenue par la méthode patch-clamp excisé "inside-out". L'application de 2 mM ATP permet de bloquer les canaux K_{ATP} présents dans le morceau de membrane. Le passage dans une solution ne contenant pas d'ATP ouvre les canaux, induisant une déflexion du signal qui traduit une entrée d'ions potassium. L'ajout d'une solution à 100 μ M ATP provoque la fermeture partielle des canaux permettant ainsi de mettre en évidence l'effet de certains composés tels que les ouvreurs (en bleu).

Amplitude du courant (pA)	Filtrage(Hz)
$i < 100$	100
$100 < i < 300$	50
$i > 300$	10

TABLE 6.2 – Fréquences de filtrage des enregistrements suivant l'amplitude du courant.

ligne de base. Les valeurs sont par la suite exportées dans un fichier .log puis importées dans Excel. Pour faciliter le traitement statistique des résultats, les valeurs de courant obtenues sont normalisées par rapport à celles mesurées en absence d'ATP (courant maximum, canaux ouverts) et en présence de 2 mM ATP (courant minimum, canaux fermés). Elles sont ensuite rassemblées pour pouvoir réaliser les études statistiques. Chaque enregistrement est noté de 1 à 5, suivant leur qualité, ce critère servant ensuite au tri des données.

Les ajustements des courbes ont été réalisés avec le logiciel Origin 5.0 (Origin-Lab). Afin de déterminer les EC_{50} (ouvreurs) ou les IC_{50} (ATP), différentes versions de l'équation de Hill ont été utilisées. Dans le cas des ouvreurs, l'équation suivante a été appliquée :

$$f([x]) = i_0 + \frac{i_{max}}{1 + (\frac{EC_{50}}{[x]})^h}$$

Où,

- $[x]$, la concentration d'ouvreur.
- i_0 , le courant mesuré en absence d'ouvreur.
- i_{max} , le courant maximal mesuré suite à l'application de l'ouvreur.
- EC_{50} , la concentration pour laquelle la moitié de l'effet maximal est observée.
- h , le coefficient de Hill.

Pour l'ATP, l'équation utilisée est celle-ci :

$$f([x]) = \frac{i_0}{1 + (\frac{[x]}{IC_{50}})^h}$$

Où,

- $[x]$, la concentration d'ATP.
- i_0 , le courant mesuré en absence d'ATP.
- IC_{50} , la concentration pour laquelle la moitié de l'inhibition est observée.
- h , le coefficient de Hill.

Les données sont représentées en courant normalisé \pm s.e.m. Avec s.e.m., l'erreur standard ("Standard Error of the Mean") : $s.e.m. = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$.

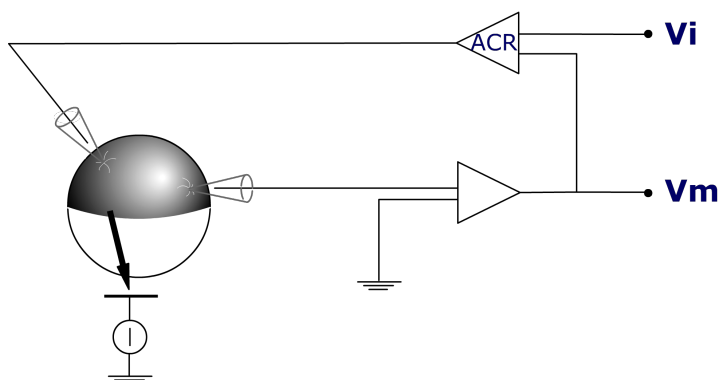


FIGURE 6.8 – Principe de la méthode de double micro-électrodes.

6.2 Double micro-électrodes

6.2.1 Principe

Du fait de son diamètre important, l'ovocyte de xénope ne permet pas l'étude des courants macroscopiques par patch-clamp en configuration cellule entière. En effet, dans ce cas, le maintien du potentiel imposé à toute la cellule avec une micropipette s'avère impossible car cela entraînerait des biais dus au phénomène de "space clamp". Cependant, la taille de l'ovocyte de xénope permet d'utiliser la technique dite de double micro-électrodes ou two-electrode voltage clamp (TEVC). Cette technique consiste à maintenir constant le potentiel de membrane de la cellule (V_m) et ce à une valeur (V_i) déterminée par l'expérimentateur (fig. 6.8). Un amplificateur à contre réaction (ACR, Geneclamp 500B, Axon Instruments) injecte un courant (I) qui doit être égal et de signe opposé à celui engendré par les canaux ioniques présents à la membrane afin d'annuler la différence ($V_i - V_m$).

6.2.2 Conditions expérimentales

Dans un premier temps, les solutions de ligands sont préparées dans du bain TEVC de composition suivante : KCl 91 mM, HEPES 5 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1 mM, acide niflumarique 0,3 mM, pH 7,4. Les micropipettes sont étirées à partir de capillaires de borosilicate (Kimble Product Inc.) de façon à obtenir un diamètre de quelques micromètres, soit une résistance aux alentours de 0,2–0,3 $\text{M}\Omega$. Elles sont par la suite remplies d'une solution de KCl 3 M puis placées sur les électrodes de mesure et de stimulation. Au début de l'expérience, les ovocytes sont disposés dans une chambre de perfusion (Automate Scientific) dans le bain TEVC. Le système de perfusion utilisé est le ValveLink 8.2 (Automate Scientific). Le protocole utilisé impose des pulses de voltage de 500 ms à -50, 0 et 50 mV à intervalles de 5 secondes. Dans ces conditions, le courant potassique mesuré est entrant à -50 mV. Le système

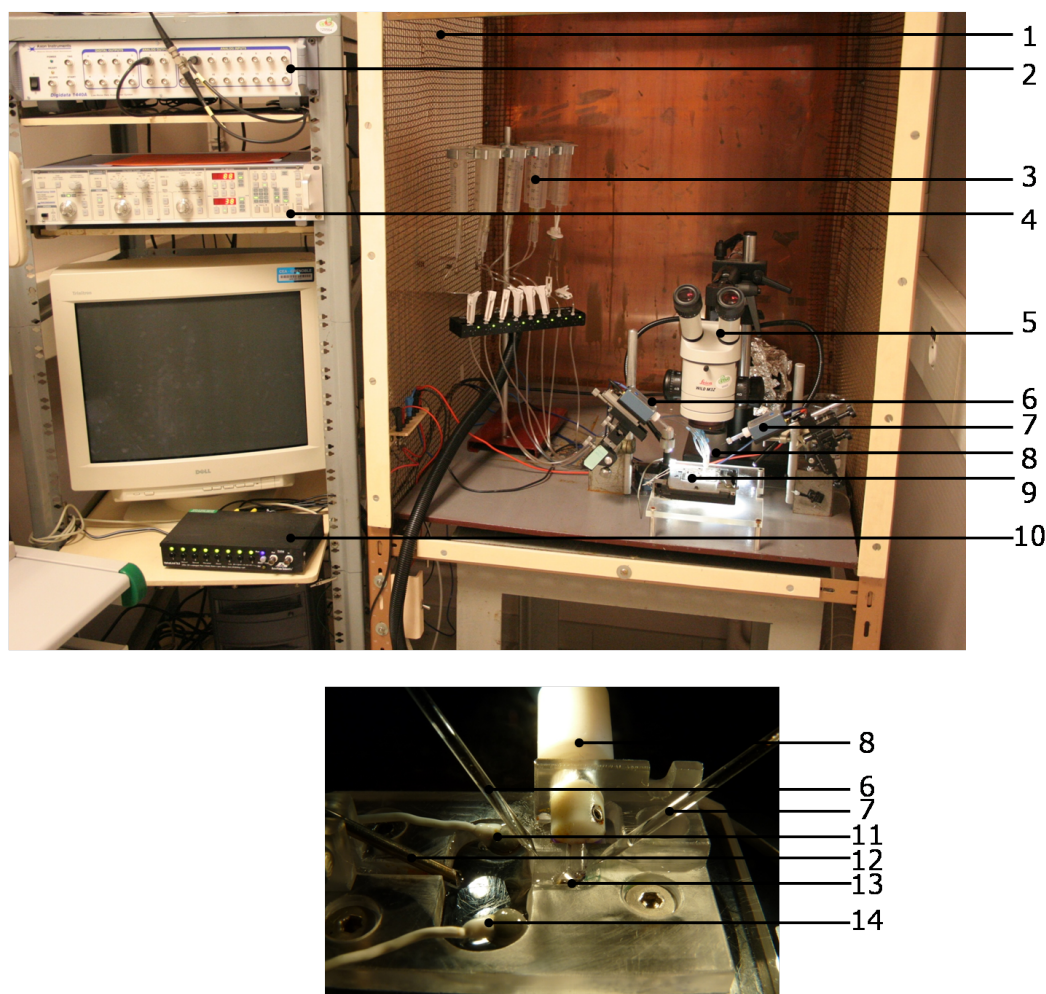


FIGURE 6.9 – Poste de double micro-électrode.

d'acquisition utilisé est le Digidata1440A (Molecular Devices). La variation de courant est observable via le logiciel d'acquisition Clampex 10.0 (Molecular Devices).

6.2.3 Traitement des données

Lors de l'acquisition des enregistrements, ceux-ci sont échantillonnés à une fréquence de 1 KHz. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Clampfit10 (Molecular Devices). Les valeurs obtenues sont alors transférées dans un fichier Excel afin de calculer les courants engendrés par les canaux étudiés. Afin de normaliser les courants, le zéro est déterminé suite à l'ajout de baryum 3 mM et le 1 dans le bain. La formule appliquée est la suivante :

$$i_{\text{normalisé}} = \frac{i - i_{Ba^{2+}}}{i_{\text{bain}} - i_{Ba^{2+}}}$$

	Description
1	Cage de Faraday
2	Digidata 1440a (Molecular Devices)
3	Perfusions
4	Geneclamp 500 (Axon Instruments)
5	Microscope (Wild M3Z, Leica)
6	Electrode de stimulation
7	Electrode de mesure
8	Tête de perfusion
9	Chambre de perfusion (Automate Scientific)
10	ValveLink 8.2 (Automate Scientific)
11–14	Electrodes de référence
12	Dispositif d'aspiration
13	Ovocyte

TABLE 6.3 – Les différents composants du poste de double micro-électrodes.

Où i est le courant mesuré lors de l'application d'un ligand, $i_{Ba^{2+}}$ le courant mesuré en présence de baryum et i_{bain} le courant mesuré dans le bain (fig. 6.10). Lorsque le phénomène (activation ou inhibition) induit par un ligand est réversible, la variation de courant est mesurée par rapport à la valeur déterminée dans le bain avant et après application du composé. Ceci a pour conséquence de sous-estimer quelque peu l'importance des effets observés. Néanmoins, dans le cas des courbes concentration-réponse et des phénomènes irréversibles, la variation de courant est calculée par rapport au i_{bain} mesuré en début d'enregistrement. Les pourcentages d'activation et d'inhibition sont calculés comme suit :

$$Pourcentage_{activ/inhib} = (i_{normalisé} - 1) \cdot 100$$

Où $i_{normalisé}$ est la valeur obtenue suite à l'application d'un composé. Cette valeur est calculée par rapport au 1 et au 0 obtenus dans le bain et en présence de baryum 3 mM. Les données sont ensuite transférées dans le logiciel Origin 5.0 (Originlab) afin d'effectuer les ajustements ("fittings") suivant une équation de Hill standard :

$$f(x) = \frac{Max}{1 + (\frac{EC_{50}}{[x]})^h}$$

Où

- $[x]$ est la concentration en ligand,
- Max est l'effet asymptotique maximal,
- EC_{50} , la concentration pour laquelle la moitié de l'effet maximal est observée.

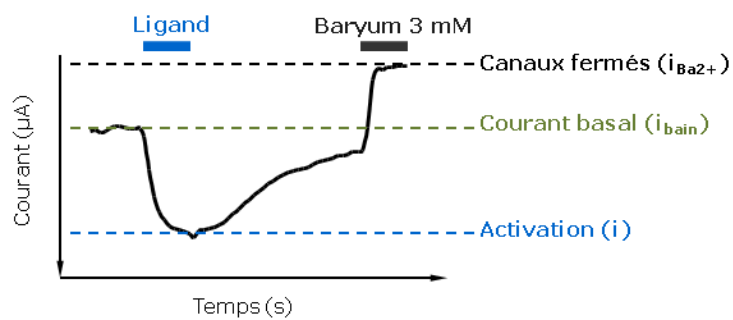


FIGURE 6.10 – Trace obtenue par la méthode de double-microélectrode. Le courant basal (i_{bain}) est mesuré dans le bain TEVC (en vert), $i_{Ba^{2+}}$ est déterminé en présence de Ba^{2+} à 3 mM.

Les données sont représentées en pourcentage d'activation ou d'inhibition \pm s.e.m.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 7

Canal K_{ATP}

7.1 Test de composés sur le canal K_{ATP}

7.1.1 Position du problème

Le canal K_{ATP} , exprimé dans quelque tissu que ce soit, possède un rôle de capteur de l'activité métabolique de la cellule. Il assure des fonctions telles que la libération d'insuline, de glucagon au niveau de l'hypothalamus, la cardioprotection (cf. section 1.5.2)... En cas de dysfonctionnement, le canal K_{ATP} est donc à l'origine de pathologies à la gravité variable. Il existe d'ores et déjà des composés pouvant bloquer ou ouvrir le canal dans un but thérapeutique. Ainsi, des ouvreurs agissant sur SUR1 + Kir6.2 sont utilisés pour traiter l'hyperinsulinémie tandis que des bloqueurs sont administrés en cas de diabète (cf. section 1.5.3). Il est d'un grand intérêt de trouver de nouvelles molécules ciblant les différents canaux de manière spécifique avec une grande affinité. Dans cette optique, des chimistes tentent d'élaborer de nouveaux composés. C'est dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. V. Cecchetti de l'Université de Pérouse que nous avons testé des dérivés benzothiazines pouvant potentiellement agir sur l'ouverture du canal K_{ATP} .

7.1.2 Test de composés sur le canal K_{ATP}

7.1.2.1 Méthodologie adoptée

Douze composés, séparés en trois lots, dont l'effet avait été testé sur des artères de rats (mesure de la vasodilatation) nous ont été envoyés. Nous avons appliqué ses douze molécules sur des ovocytes exprimant SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 et mesuré les modifications induites en "patch-clamp" excisé "inside-out". Nous avons testé chaque composé à différentes concentrations (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) en présence d'ATP à 100 μ M, exceptés K0CN7 et K0CF7 pour cause d'instabilité à l'air. Le résumé des expériences est décrit dans le tableau 7.1.

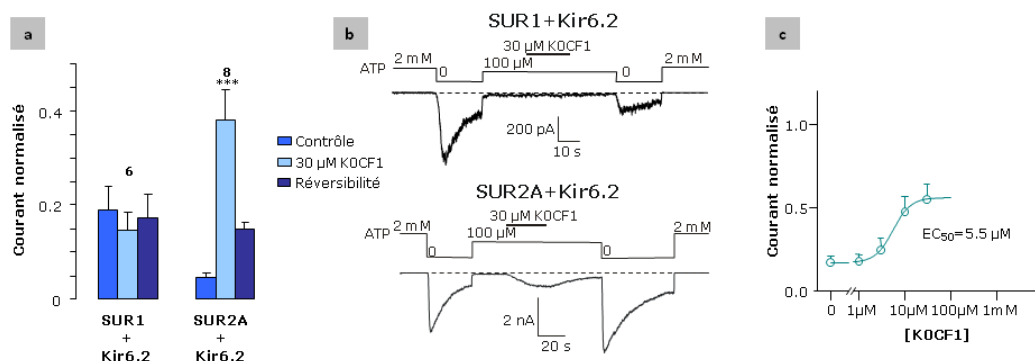


FIGURE 7.1 – Effet du composé K0CF1 sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. (a.) Effet de K0CF1 sur SUR1 et SUR2A + Kir6.2 à 30 μM en présence de 100 μM ATP. "Contrôle" = 100 μM ATP avant application du composé, "Réversibilité" = 100 μM ATP après application du composé. ***, intervalle de confiance entre 97 et 100 %. (b.) Traces représentatives obtenues en "patch-clamp" excisé "inside-out". (c.) Courbe dose-réponse de K0CF1, l'ajustement correspond à l'équation de Hill la plus proche.

Les essais en présence et absence d'ATP permettent de mettre en évidence un effet activateur contrant l'inhibition induite par l'ATP. Quatre composés positifs sont ressortis de ce mini-criblage : K0CN1, K0CF1, PTC1-6Cl7Cl et PTC1-6Cl7F. Ces quatre molécules sont des ouvreurs spécifiques de SUR2A + Kir6.2 et SUR1 + Kir6.2.

K0CF1 à 30 μM , en présence d'ATP 100 μM , active spécifiquement SUR2A + Kir6.2 (30 % d'activation environ), de manière réversible et significative. La courbe dose-réponse effectuée nous donne une EC₅₀ de 5,45 μM (fig. 7.1). Ce composé a été testé en absence d'ATP et ne montre aucun effet sur SUR2A + Kir6.2 dans ces conditions (fig. 7.5). Cela signifie que K0CF1 agit sur SUR2A + Kir6.2 en réduisant l'inhibition par l'ATP. K0CN1 est le second composé identifié comme agissant sur SUR2A + Kir6.2 (activation autour de 40 % à 30 μM). Tout comme K0CF1, il s'agit d'un ouvreur dont l'effet est réversible. Si nous observons la courbe dose-réponse, nous remarquons qu'aux concentrations élevées, le palier n'est pas atteint. En effet, nous n'avons pas pu tester des concentrations plus élevées car nous avons atteint la limite de solubilité du composé. Nous pouvons cependant estimer que l'EC₅₀ se situe aux alentours de 220 μM (fig. 7.2).

PTC1-6Cl7F est, quant à lui, actif sur le canal K_{ATP} composé par SUR1 + Kir6.2. L'ajout de ce composé à 30 μM induit une activation réversible d'environ 40 %. De plus, son application sur SUR2A + Kir6.2 ne provoque aucun changement significatif de courant, que ce soit en présence ou en absence d'ATP (fig. 7.5). La courbe dose-réponse présente le même profil que la précédente, nous n'avons pas pu obtenir de plateau dans les concentrations élevées et nous ne pouvons qu'estimer

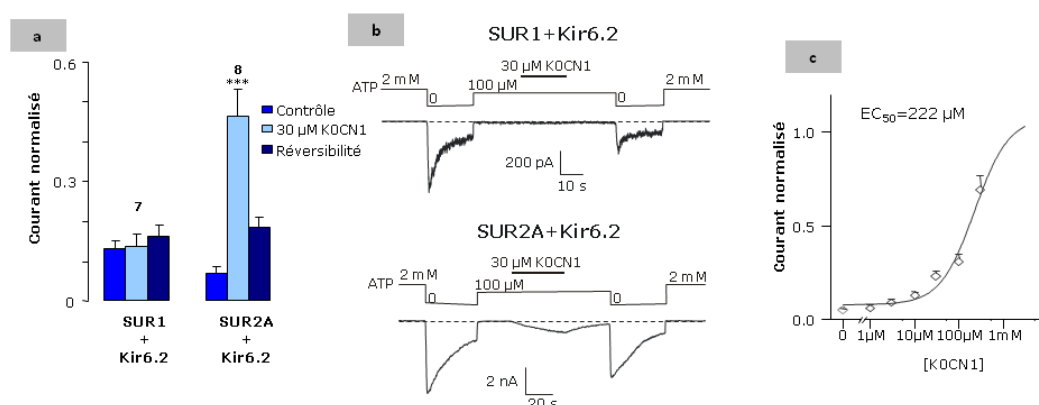


FIGURE 7.2 – Effet du composé K0CN1 sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. (a.) Effet de K0CN1 sur SUR1 et SUR2A + Kir6.2 à 30 μ M en présence de 100 μ M ATP. "Contrôle" = 100 μ M ATP avant application du composé, "Réversibilité" = 100 μ M ATP après application du composé. ***, intervalle de confiance entre 97 et 100 %. (b.) Traces représentatives obtenues en "patch-clamp" excisé "inside-out". (c.) Courbe dose-réponse de K0CN1, l'ajustement correspond à l'équation de Hill la plus proche. Potentiel : -50 mV.

l'EC₅₀ comme se situant aux environs de 140 μ M (fig. 7.3). PTC1-6Cl7Cl est également un ouvreur spécifique de SUR1 + Kir6.2. L'activation d'environ 50 % induite par 30 μ M PTC1-6Cl7Cl, en 100 μ M ATP, est significative, mais irréversible. Le composé est donc bloqué dans son site de liaison et il est très difficile de l'en déloger par simple lavage, même prolongé. La courbe dose-réponse n'a pas pu être effectuée pour cause d'ovocytes de mauvaise qualité (fig. 7.4).

7.1.2.2 Discussion

Nous avons donc mis en évidence quatre composés ayant un effet positif sur SUR1 + Kir6.2 (PTC1-6Cl7Cl et PTC1-6Cl7F) et sur SUR2A + Kir6.2 (K0CN1 et K0CF1). Nous ne connaissons cependant pas les formules développées de ces molécules puisqu'elles ne nous ont pas été fournies. Deux composés, K0CN7 et K0CF7 semblaient, d'après le Dr. Cecchetti avoir un certain potentiel. Néanmoins, leur instabilité à l'air en fait des produits difficiles à tester avec la technique de patch-clamp. Nous avons toutefois tenter de les tester, en préparant une solution en boîte à gants mais les résultats obtenus n'ont montré aucun effet probant sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. Nous avons donc abandonné les tests de ces composés. Les ouvreurs tels que K0CN1, K0CF1, PTC1-6Cl7F ou encore PTC1-6Cl7Cl, agissant spécifiquement sur SUR2A + Kir6.2 ou SUR1 + Kir6.2 respectivement, peuvent constituer de futurs médicaments permettant de traiter des pathologies telles que l'hyperinsulinémie (SUR1 + Kir6.2). Le but était de trouver des composés ayant une forte affinité

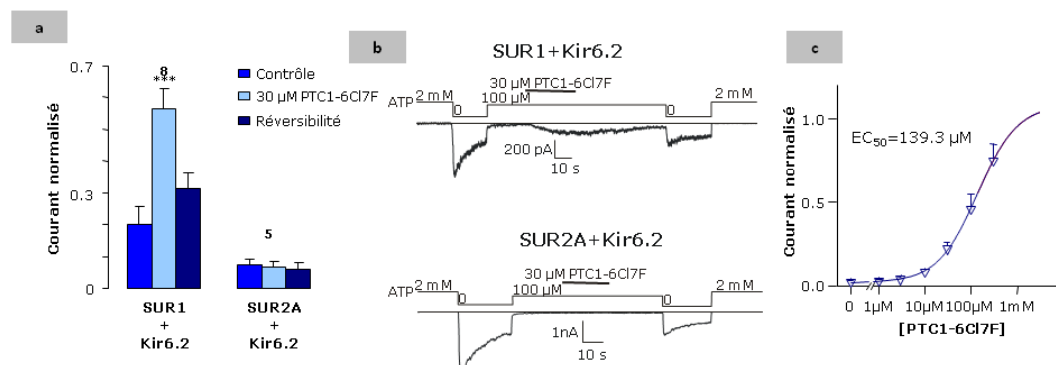


FIGURE 7.3 – Effet du composé PTC1–6Cl7F sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2.(a.) Effet de PTC1–6Cl7F sur SUR1 et SUR2A + Kir6.2 à 30 μ M en présence de 100 μ M ATP. "Contrôle" = 100 μ M ATP avant application du composé, "Réversibilité" = 100 μ M ATP après application du composé. ***, intervalle de confiance entre 97 et 100 %.(b.) Traces représentatives obtenues en "patch-clamp" excisé "inside-out". (c.) Courbe dose-réponse de PTC1–6Cl7F, l'ajustement correspond à l'équation de Hill la plus proche. Potentiel : -50 mV.

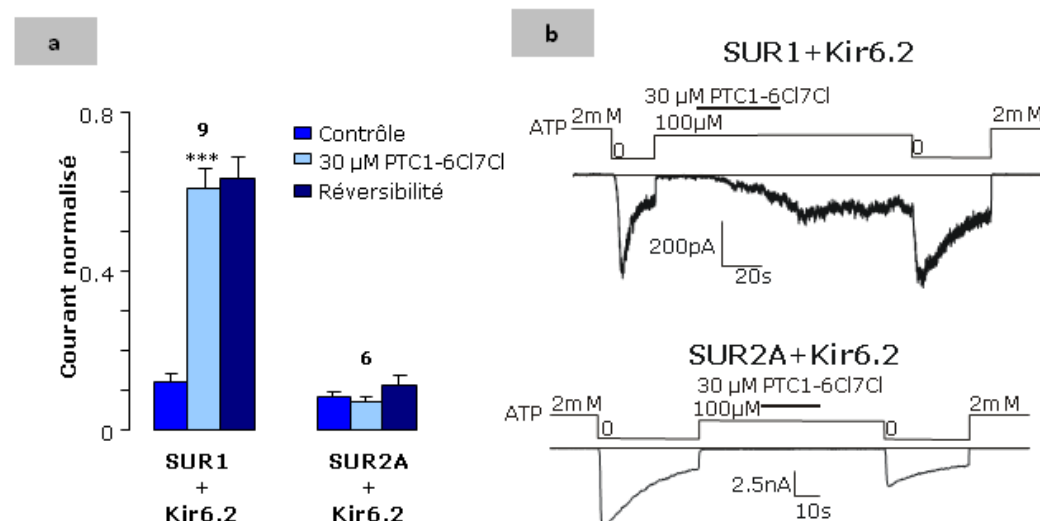


FIGURE 7.4 – Effet du composé PTC1–6Cl7Cl sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2.(a.) Effet de PTC1–6Cl7Cl sur SUR1 et SUR2A + Kir6.2 à 30 μ M en présence de 100 μ M ATP. "Contrôle" = 100 μ M ATP avant application du composé, "Réversibilité" = 100 μ M ATP après application du composé. ***, intervalle de confiance entre 97 et 100 %.(b.) Traces représentatives obtenues en patch-clamp excisé "inside-out". Potentiel : -50 mV.

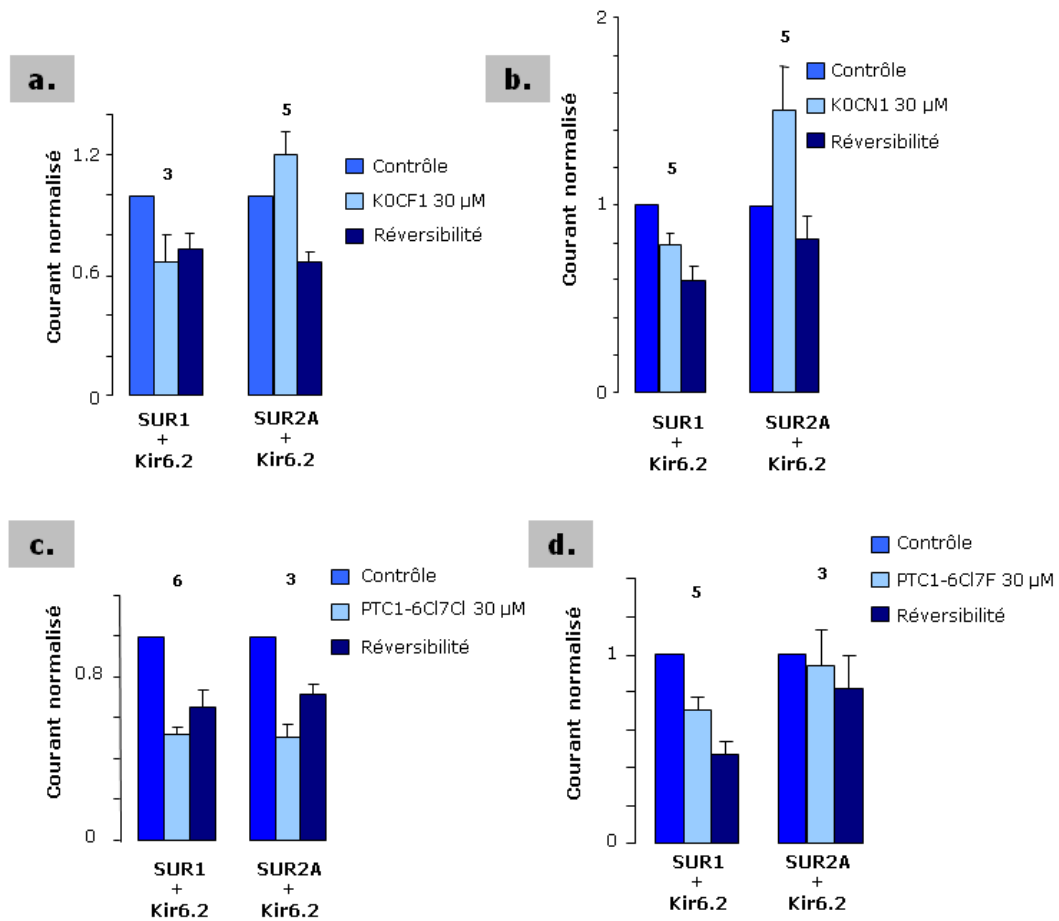


FIGURE 7.5 – Effet des composés K0CN1 (a), K0CF1 (b), PTC1-6Cl7Cl (c), PTC1-6Cl7F (d) sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 en 0 μ M ATP. L'inhibition observée en (b), (c) et (d) est due au "run-down". Potentiel : -50 mV.

Lot	Composés	Testé à 10, 30 et 100 μ M	Effet sur SUR1 + Kir6.2 en 100 μ M ATP	Effet sur SUR2A + Kir6.2 en 100 μ M ATP	Effet sur SUR1 + Kir6.2 en 0 μ M ATP	Effet sur SUR2A + Kir6.2 en 0 μ M ATP
Lot 1	K0CF1	Oui	-	+++	-	-
	K0CF7*	Non	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	K0CN1	Oui	-	+++	-	-
	K0CN7*	Non	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	K0Br3	Oui	-	-	-	-
Lot 2	K0Br3D	Oui	-	-	-	-
	K1Br3D	Oui	-	-	-	-
	K2Br3D	Oui	-	-	-	-
Lot 3	PTC1-7Me	Oui	-	-	-	-
	PTC1-7OMe	Oui	-	-	-	-
	PTC1-6Cl7Cl	Oui	+++	-	-	-
	PTC1-6Cl7F	Oui	++	-	-	-

TABLE 7.1 – Récapitulatif des composés testés. *L'instabilité à l'air de ces deux composés a rendu leur préparation et leur test difficiles.

pour le canal K_{ATP} . Les EC_{50} obtenues sont du même ordre que celles des ouvreurs déjà existants (diazoxide : 140 μ M sur SUR1, 76 μ M sur SUR2A, pinacidil : 100 μ M sur SUR2A + Kir6.2 [205]).

7.2 Etude de l'effet de pesticides sur le canal K_{ATP}

7.2.1 Position du problème

De nos jours, les pesticides sont utilisés de manière courante. De nombreux cas d'intoxication suite à l'exposition à de tels composés ont été recensés. Ils touchent principalement les agriculteurs qui, lors de l'exercice de leurs fonctions, sont en première ligne. Ainsi, l'amitraz, un pesticide servant à éliminer un bon nombre d'insectes, peut provoquer chez l'Homme des symptômes tels que l'hyperglycémie, la bradycardie, l'hypotension, ou dans les cas les plus graves, le coma [2]. La nature de ces effets pourrait laisser à penser que le canal K_{ATP} constitue une des cibles de cet insecticide. Dans cette optique, nous avons testé l'amitraz sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 en "patch-clamp" excisé "inside-out".

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés à un insecticide appartenant à la classe des benzoylurées, le diflubenzuron. Ce dernier agirait en inhibant la synthèse de chitine, composant essentiel de l'exosquelette des insectes. En outre, il a été montré que cet insecticide agissait sur le transporteur D_{SUR} , que

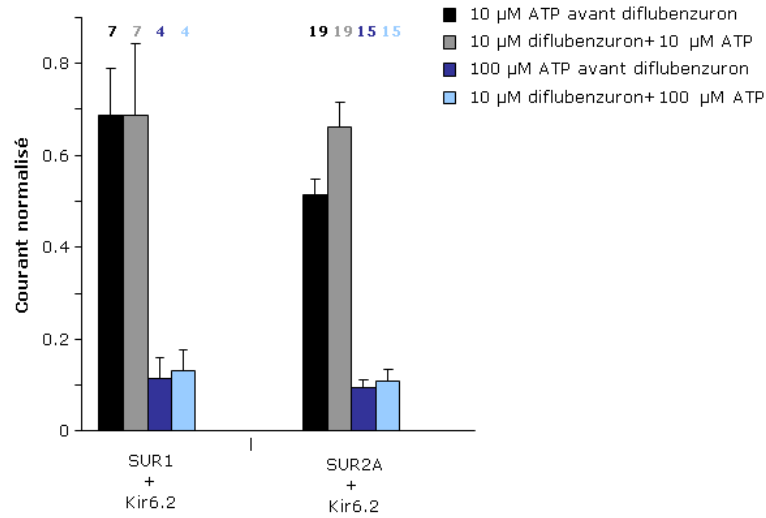


FIGURE 7.6 – Effet du diflubenzuron sur le canal K_{ATP} . Le diflubenzuron a été testé sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 en présence de 10 μ M ATP ou 100 μ M ATP. Potentiel : -50 mV.

l'on retrouve chez *Drosophila melanogaster*. Ce transporteur est très proche du SUR humain, et, lorsqu'il est exprimé seul en ovocytes de xénope, produit un courant potassique sensible au glibenclamide [213]. D_{SUR} semble être impliqué dans l'embryogenèse de la drosophile. De plus, des expériences réalisées sur des larves de blatte et de drosophile ont mené à la conclusion que le glibenclamide (inhibiteur des canaux K_{ATP}) et le diflubenzuron avaient des effets similaires sur le développement de ces larves [1]. Ceci suggère donc que le diflubenzuron possède la même cible que le glibenclamide, connu pour inhiber D_{SUR} *in vitro*. D_{SUR} étant très proche de SUR humain, nous avons décidé d'étudier les effets du diflubenzuron sur le canal K_{ATP} .

7.2.2 Résultats

7.2.2.1 Effet du diflubenzuron

Le diflubenzuron a été testé sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2, et ce, en présence d'ATP à 10 μ M et 100 μ M. Nous remarquons que, dans le cas de SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2, le diflubenzuron n'entraîne aucune modification significative de courant à 10 μ M en présence 10 μ M ATP. Ceci aurait pu nous permettre de mettre en évidence un effet inhibiteur du diflubenzuron, ce qui n'est apparemment pas le cas. De la même façon, nous n'observons pas de changement de courant significatif induit par le diflubenzuron appliqué à 10 μ M en présence d'ATP à 100 μ M.

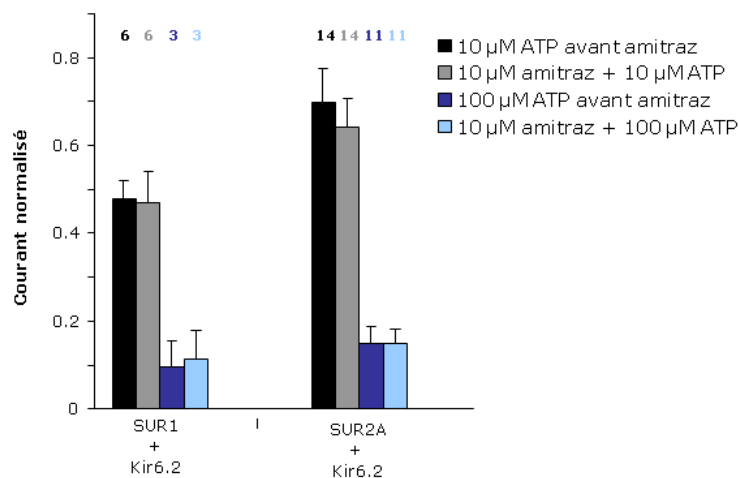


FIGURE 7.7 – Effet de l'amitraz sur le canal K_{ATP} . L'amitraz a été testé sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 en présence de 10 μ M ATP ou 100 μ M ATP. Potentiel : -50 mV.

7.2.2.2 Effet de l'amitraz

Nous avons appliqué de l'amitraz à 10 μ M sur les canaux K_{ATP} composés par SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2, et ce, en présence de deux concentrations d'ATP différentes (10 et 100 μ M). L'ajout concomitant d'amitraz à 10 μ M et d'ATP à 10 μ M ne provoque aucune modification significative de courant, fait également observé en présence d'ATP 100 μ M.

7.2.3 Discussion

Les résultats obtenus tendent à montrer que l'amitraz et le diflubenzuron n'ont pas d'effet sur les canaux K_{ATP} composés par SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. Néanmoins, pour pouvoir complètement conclure, il faudrait effectuer des doses-réponse pour chaque composé. La concentration de 10 μ M est relativement élevée en comparaison des EC_{50} de certains ouvreurs ou inhibiteurs (cf. section 1.5.3). Le diflubenzuron possède un groupement urée, tout comme le glibenclamide et le tolbutamide, bloqueurs bien connus du canal K_{ATP} . Il semble de plus cibler D_{SUR} , homologue du récepteur SUR de mammifère [6]. Ce même récepteur est bloqué par le glibenclamide. Nous nous attendions donc à observer une inhibition du canal K_{ATP} par le diflubenzuron, ce qui n'est pas le cas. Cela suggère que le glibenclamide n'agit pas de la même manière sur SUR et D_{SUR} , supposant l'existence d'un autre site d'interaction dans D_{SUR} . Il a été montré que D_{SUR} présentait une séquence unique de 1,7 kb. Cette protéine pourrait donc posséder un site d'action différent de SUR.

pour le glibenclamide et le diflubenzuron.

L'amitraz ne semble pas avoir moduler l'activité des canaux K_{ATP} constitués de SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. Les symptômes observés en cas d'intoxication (hyperglycémie, hypotension...) résultent de l'interaction du composé avec le récepteur α_{2D} adrénergique [2] et ne masqueraient pas d'éventuels effets sur le canal K_{ATP} .

Chapitre 8

ICCR

8.1 Nouveaux ICCR : de la conception à la caractérisation

8.1.1 Position du problème

Dans le laboratoire, deux ICCR ont été élaborés [206]. Le premier fait intervenir le récepteur muscarinique M2 (M2–K0-25) et le second le récepteur dopaminergique D2 (D2–K0-25). De nombreuses manipulations d'ingénierie génétique ont été nécessaires afin d'optimiser le couplage entre les GPCR et Kir6.2. Cette étape réalisée, la liaison des ligands respectifs sur ces deux ICCR provoque, pour le M2–K0-25, une ouverture du canal et pour le D2–K0-25 une fermeture. Ces deux comportements opposés ont levé quelques interrogations quant au mécanisme de couplage existant entre ces GPCR et Kir6.2. Le canal Kir6.2 a été choisi, tout d'abord, pour des raisons historiques. En effet, le canal K_{ATP} est un des centres d'attention de l'équipe depuis de nombreuses années. De plus, Kir6.2 constitue un candidat idéal puisque son "gating", au sein du canal K_{ATP} , est régulé par un récepteur (SUR). Ainsi, il semblait plausible d'utiliser ce canal pour élaborer ces biocapteurs.

Afin de comprendre plus avant le mécanisme à l'origine de la communication entre deux protéines, qui, naturellement, ne fonctionnent pas de concert, il a semblé nécessaire de construire de nouveaux ICCR. De plus, la compréhension du fonctionnement des ICCR pourrait apporter des éléments concernant la régulation du "gating" de Kir6.2.

Le choix des GPCR à coupler à Kir6.2 s'est porté sur les récepteurs β_2 adrénergique (β_2), dopaminergique D3 (D3), cannabinoïde 1 (CB1), CCR2 et l'opsine (ops). En se basant sur les données obtenues avec les ICCR pionniers M2–K0-25 et D2–K0-25, nous avons construit les ICCR β_2 –K0-25, D3–K0-25, CB1–K0-25, CCR2–K0-25 et ops–K0-25. Nous nous sommes ensuite attelés, lorsque cela était nécessaire à l'optimisation de ces couples (amélioration de l'expression de surface ou de la

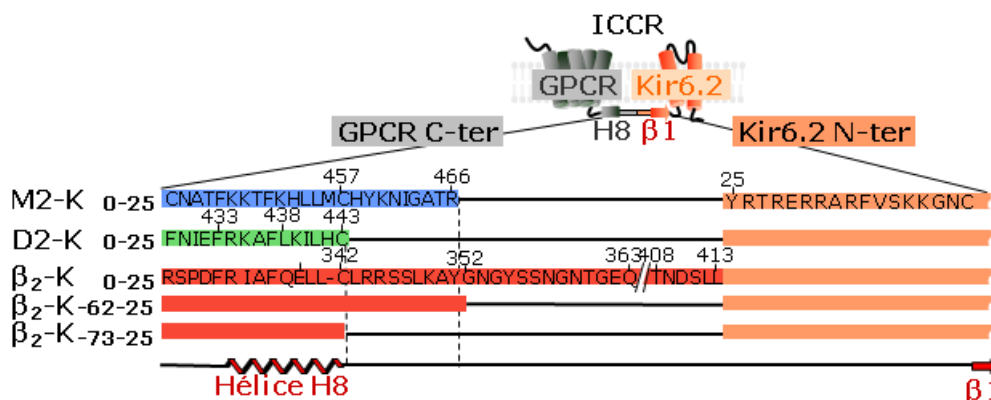


FIGURE 8.1 – Alignement de la zone de fusion entre différents GPCR et Kir6.2. L'alignement des extrémités C-ter de M2, D2 et β_2 est possible grâce à la présence de l'hélice H8 et d'une cystéine palmitoylée conservées. Le récepteur β_2 adrénergique possède 62 résidus en C-ter de plus que M2 et 73 de plus que D2.

communication) par ingénierie génétique. Les choix de l'opsine et du récepteur β_2 adrénergique pourraient s'avérer utiles dans le cadre de la compréhension du mécanisme des ICCR et dans l'élaboration de modèles moléculaires puisque les structures de ces GPCR sont connues. Les tests de fonctionnalité ont été effectués en utilisant la technique de double micro-électrodes sur ovocyte de xénope (cf. section 6.2).

8.1.2 Construction des couples β_2 -Kir6.2

Le couple β_2 -K0-25 a été construit au laboratoire par Christophe Moreau (cf. section 4.2.3). Les tests de fonctionnalité de cet ICCR n'étant pas probants, il a fallu modifier le couplage pour obtenir une réponse suite à la liaison d'un ligand adrénergique. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche reposant sur l'alignement de séquences des extrémités C-ter du M2, D2 et β_2 . Cet alignement est possible grâce à la présence d'une hélice conservée en C-ter des GPCR de classe A, l'hélice H8 (fig. 8.1). Ainsi, nous avons décidé de supprimer 62 et 73 acides aminés du C-ter de β_2 dans le but d'obtenir la même longueur de "linker" que M2-K0-25 et D2-K0-25, respectivement (fig. 8.2). Les deux ICCR résultants sont appelés "M2-like" et "D2-like". Nous suspectons en effet la longueur du "linker" comme étant déterminante pour la qualité du couplage entre le GPCR et Kir6.2.

8.1.2.1 Avant la fonctionnalité, l'expression

De manière générale, le courant basal reflète de façon proportionnelle le niveau d'expression membranaire de canaux ioniques. Ainsi, afin de déterminer si le niveau d'expression est suffisant pour l'étude des ICCR nous mesurons au préalable

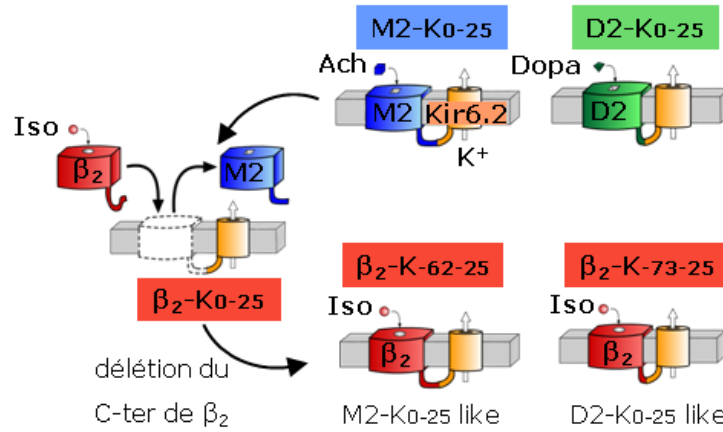


FIGURE 8.2 – Stratégie mise en œuvre pour élaborer les ICCR basés sur le récepteur β_2 adrénergique.

le courant basal. Ainsi, comme le montre la figure 8.3, les constructions β_2 -K0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 présentent un niveau d'expression proche de celui des ovocytes non injectés témoignant d'un déficit d'expression de surface. Cette faible expression étant un obstacle à l'étude de la fonctionnalité des ICCR, nous avons tenté de corriger ce problème. Dans ce but, nous avons adopté trois approches différentes.

L'une d'entre-elles est basée sur l'utilisation d'un mutant du récepteur β_2 adrénergique (Glu122Trp) connu pour augmenter son expression de surface dans les cellules d'insecte sf9 [254]. Cette mutation concerne un résidu situé dans l'hélice III, à l'interface entre les hélices III-IV-V. Elle est à une position équivalente à celle d'un Trp présent dans la rhodopsine, récepteur connu pour sa relative stabilité conformationnelle. Ainsi, la substitution de la Glu122 par un Trp aboutit à la formation d'un récepteur β_2 adrénergique plus stable que le "sauvage", et ce, en contraignant le mouvement d'une Pro située dans l'hélice V. Les courants de base mesurés avec ces mutants (β_2 E122W-K0-25, β_2 E122W-K-62-25 et β_2 E122W-K-73-25) sont, tout comme dans le cas des types "sauvages", aux environs de $0,2 \mu\text{A}$, valeur proche du courant basal d'ovocytes non injectés (fig. 8.3(a)).

Une autre approche repose sur la co-expression de TMD0 (premier domaine transmembranaire de SUR1) avec β_2 -K0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25. Celui-ci a été montré comme étant capable d'interagir avec Kir6.2 et de moduler ses propriétés biophysiques [20, 46, 81]. Ce domaine est également suspecté de faciliter l'accès de Kir6.2 à la membrane plasmique. Les courants basaux sont, en moyenne, multipliés par cinq, passant d'environ $0,2 \mu\text{A}$ à $0,8 \mu\text{A}$ pour β_2 -K0-25, de $0,25 \mu\text{A}$ à $1,2 \mu\text{A}$ pour β_2 -K-62-25 et de $0,15 \mu\text{A}$ à $0,8 \mu\text{A}$ pour β_2 -K-73-25 (fig. 8.3(a)). La co-expression de TMD0 avec ces ICCR permet donc d'augmenter leur expression. Non contents de cette découverte, nous avons tout de même voulu, dans une optique de simplification

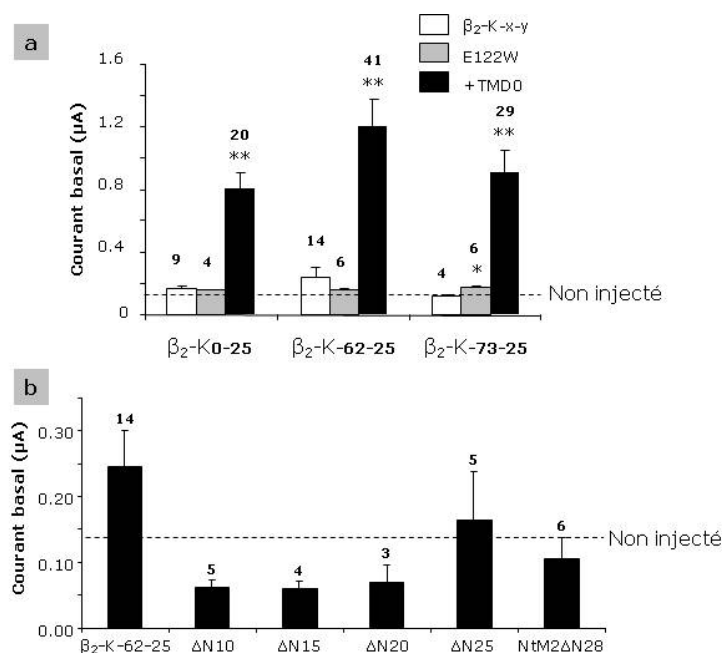


FIGURE 8.3 – Courants basaux obtenus avec les différentes constructions testées. (a) Les courants de base de β_2 -K-0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 sont proches de celui des ovocytes non injectés. Il en est de même pour les ICCR comprenant le mutant β_2 E122W. La co-expression de β_2 -K-0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 avec TMD0 augmente environ cinq fois la valeur du courant basal. (b) Les délétions N-terminales du récepteur β_2 adrénergique au sein des fusions avec Kir6.2 n'augmentent pas le courant de base. Potentiel : -50 mV.

du système, trouver un moyen de nous affranchir de ce domaine accessoire.

Nous avons également opté pour la délétion progressive de l'extrémité N-ter de β_2 . En effet, il a été montré, avec les récepteurs CB1 et α_{1D} adrénergique que la suppression d'un certain nombre d'acides aminés en N-ter permet d'améliorer leur niveau d'expression [10, 105]. Le mécanisme à la base de cette observation serait lié à la facilitation de la translocation de ces récepteurs à la sortie du RE. Nous avons progressivement délété le N-ter du récepteur β_2 adrénergique dans la construction β_2 -K-62-25 (Δ N10, Δ N15, Δ N20, Δ N25). Quelle que soit la longueur de la délétion, aucun effet positif n'est observé sur le niveau de courant basal mesuré et, par conséquent, sur l'expression des protéines de fusion. Nous avons également tenté de remplacer l'extrémité N-ter de β_2 par celle de M2 (NtM2 Δ N28, le niveau d'expression de M2-K-0-25 étant relativement élevé). Cette manipulation n'a pas donné lieu à des résultats probants (fig. 8.3(b)).

A l'issue de ces expériences, nous avons décidé d'étudier la fonctionnalité de β_2 -K-0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 en les co-exprimant avec TMD0.

8.1.2.2 Les couples β_2 -K0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 sont-ils fonctionnels ?

Dans le but de tester la fonctionnalité des couples β_2 -K0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25, nous avons utilisé un agoniste total, l'isoprotérénol à 0,5 μ M. Ce composé est prescrit dans le cadre du traitement de l'asthme ou des bronchites chroniques. Les mesures effectuées avec β_2 -K0-25 montrent que la modification induite par 0,5 μ M d'isoprotérénol se situe autour de 0 %. La construction "M2-like" (β_2 -K-62-25) répond à l'isoprotérénol à hauteur de 74 % environ. Enfin, l'activation observée dans le cas de la construction "D2-like" (β_2 -K-73-25) s'élève à 44 % (fig. 8.4 (a et b)). Nous pouvons donc conclure que la construction comprenant le récepteur β_2 adrénergique dans sa totalité ne répond pas à l'isoprotérénol, suggérant que la transmission du changement de conformation provoqué par la liaison du ligand sur β_2 n'a pas lieu. Les ICCR β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 sont, quant à eux, fonctionnels puisqu'ils répondent à l'ajout d'isoprotérénol, le premier semblant plus sensible que le second (75 % vs. 40 %). Nous pouvons donc en déduire que la longueur du lien entre β_2 et Kir6.2 joue un rôle primordial dans la qualité du couplage.

Les courbes concentration-réponse d'isoprotérénol confirment que β_2 -K0-25 n'est pas fonctionnel. Un contrôle, effectué avec le récepteur β_2 co-exprimé avec Kir Δ C36 (capable de s'exprimer sans SUR) et TMD0 montre que les réponses observées ne sont pas dues à une communication indirecte entre le GPCR et Kir6.2. Les réponses de β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 sont concentrations-dépendantes et les EC₅₀ calculées avec le logiciel Origin sont égales à 155 nM et 341 nM, respectivement (fig. 8.4 (c)). Ces valeurs sont cohérentes avec celles obtenues par d'autres techniques [25, 255, 291, 339].

Nous avons exploré l'effet d'un antagoniste du récepteur β_2 adrénergique, l'alprenolol, à 5 μ M, en présence d'isoprotérénol 0,5 μ M. En premier lieu, cet antagoniste ne présente aucun effet sur le couple β_2 -K0-25. Ceci confirme ce dernier n'est pas fonctionnel et également que l'alprenolol n'a pas d'effet non spécifique sur Kir6.2 ou les ovocytes de xénope. Dans le cas de β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25, l'application d'alprenolol à 5 μ M en présence d'isoprotérénol 0,5 μ M provoque l'inhibition de la réponse induite par ce dernier (fig. 8.5). Notre système est donc capable de détecter la présence d'antagonistes.

Comme le décrit la section 2.1.1.5, il existe des ligands, appelés agonistes partiels, qui peuvent activer les GPCR dans une moindre mesure. Le salbutamol fait partie des agonistes partiels du récepteur β_2 adrénergique. Nous l'avons donc testé sur la construction la plus active, β_2 -K-62-25. La réponse obtenue est concentration-dépendante et le maximum d'activation est au même niveau que celui mesuré pour l'isoprotérénol. L'EC₅₀ du salbutamol est d'environ 400 nM (fig. 8.6). β_2 -K-62-25 peut donc détecter un agoniste partiel mais ne distingue pas, en terme d'amplitude

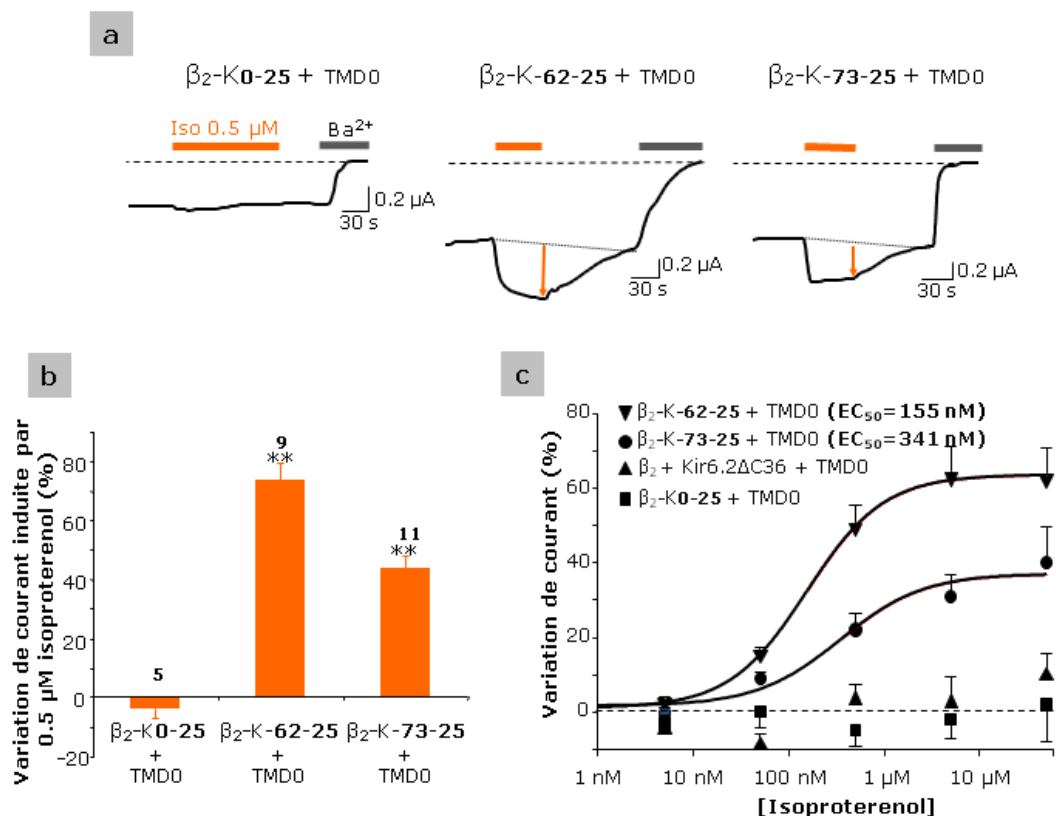


FIGURE 8.4 – Test de la fonctionnalité de $\beta_2\text{-K0-25}$, $\beta_2\text{-K-62-25}$ et $\beta_2\text{-K-73-25}$. Les valeurs sont obtenues avec la méthode de double-microélectrodes. (a) Traces de double-microélectrodes représentatives pour les trois ICCR. (a et b) $\beta_2\text{-K0-25}$ ne répond pas à l'application d'isoprotérénol 0,5 μM tandis que $\beta_2\text{-K-62-25}$ et $\beta_2\text{-K-73-25}$ sont activés à 75 % et 40 % respectivement. (c) Courbes concentration-réponse d'isoprotérénol. Les ajustements sont effectués suivant l'équation de Hill. $h=1$. ** $p<0,005$. Potentiel : -50 mV.

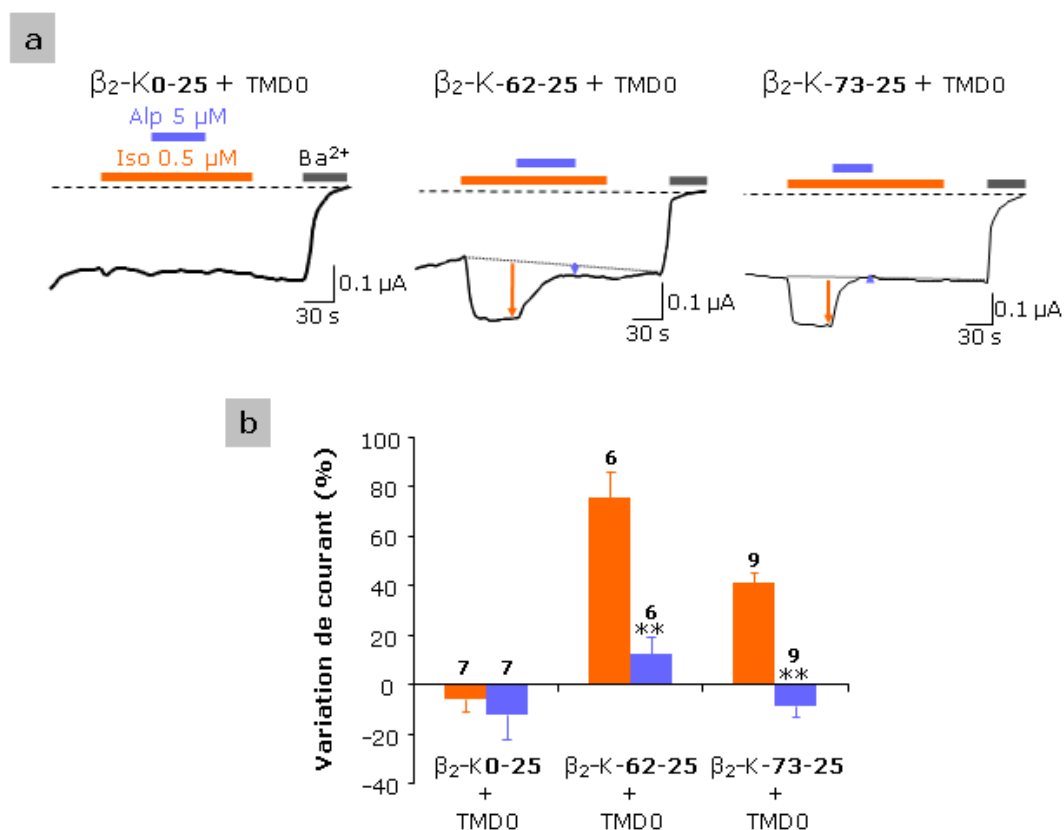


FIGURE 8.5 – Effet provoqué par un antagoniste, l'alprenolol, sur β_2 -K0-25, β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25. (a) Enregistrements représentatifs obtenus par la technique de double-microélectrodes. L'application d'alprenolol 5 μ M sur β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25 en présence d'isoprotérénol 0,5 μ M inhibe l'effet induit par ce dernier. (b) L'inhibition provoquée par l'alprenolol est de l'ordre de 65 % pour β_2 -K-62-25 et 35 % pour β_2 -K-73-25. Potentiel : -50 mV.

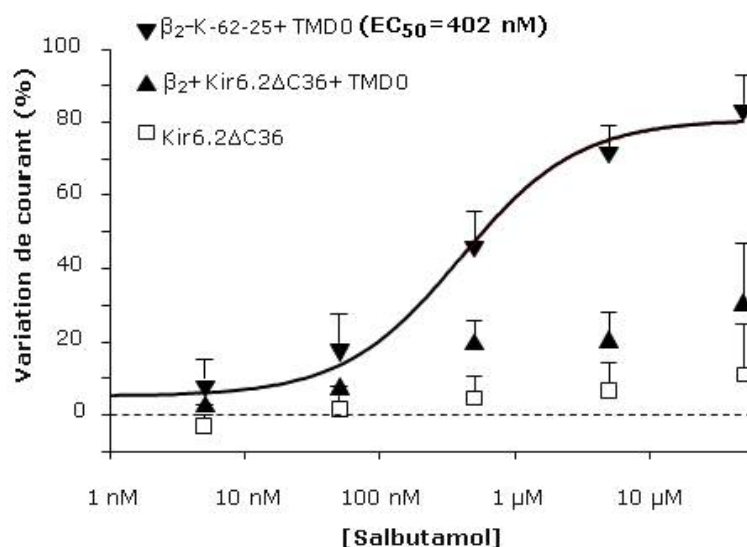


FIGURE 8.6 – Courbe concentration–réponse du salbutamol effectuée avec β_2 -K-62-25 + TMD0. L’ajustement a été réalisé suivant l’équation de Hill la plus proche. $h=1$. Potentiel : -50 mV.

réponse, un agoniste partiel d’un total. De plus le salbutamol laisse apparaître un léger effet sur β_2 co-exprimé avec Kir Δ C36 et TMD0.

Un autre type de ligand est celui des agonistes inverses. Ils peuvent inhiber l’activité constitutive (*i.e.* en absence de ligand) des GPCR en se liant préférentiellement à la configuration inactive. Pour étudier la sensibilité de notre système, nous avons appliqué du timolol, agoniste inverse du récepteur β_2 adrénergique. Nous nous attendions donc à voir une diminution du courant suite à l’ajout de ce composé. Cependant, les résultats obtenus laissent penser que le timolol n’engendre aucune réponse significative que ce soit dans le cas de β_2 -K-62-25 ou β_2 -K-73-25 (fig. 8.7). Ces deux ICCR ne seraient donc pas suffisamment sensibles pour détecter la présence d’un agoniste inverse tel que le timolol. Ceci peut être dû au fait que les changements de conformation associés à l’activité constitutive du récepteur β_2 adrénergique ne sont pas suffisamment importants pour être transmis à Kir6.2 ou que la fusion a pour conséquence une diminution de l’activité du récepteur.

8.1.2.3 Etude fonctionnelle des mutants β_2 E122W

La mutation Glu122Trp, décrite plus haut (section 8.1.2.1), a pour propriété de rendre le récepteur β_2 adrénergique plus stable, en contraignant le mouvement de la Pro211 située dans l’hélice V. Ainsi, nous avons voulu savoir si les modifications conformationnelles dues à cette mutation étaient détectables avec β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25. Pour cela, nous avons comparé les courbes concentration–réponse de

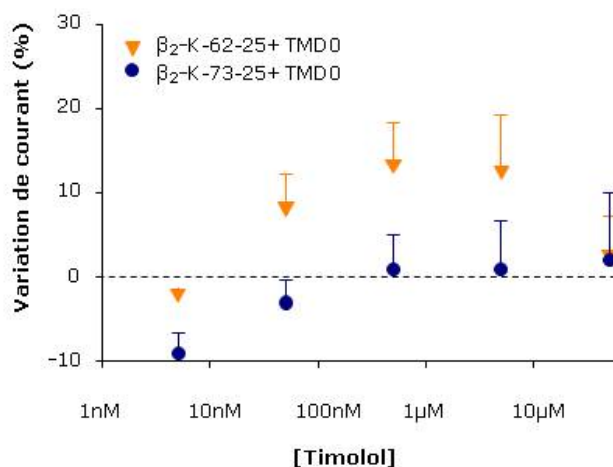


FIGURE 8.7 – Courbe concentration-réponse du timolol avec β_2 -K-62-25 et β_2 -K-73-25. Potentiel : -50 mV.

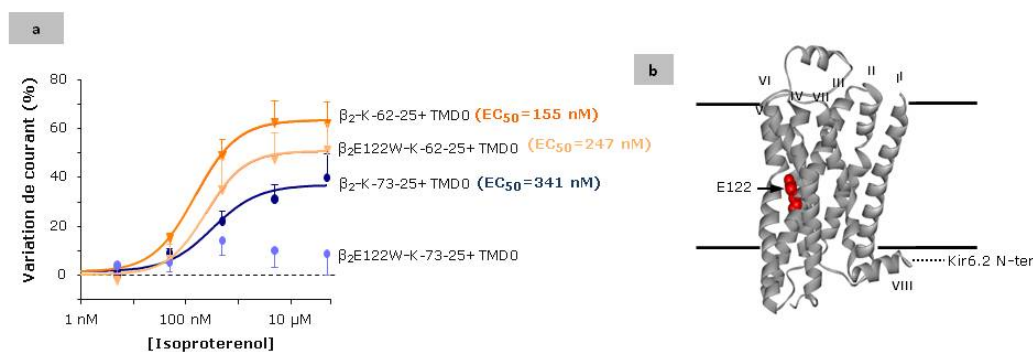


FIGURE 8.8 – (a) Courbes concentration-réponse d'isoprotérénol réalisées avec les mutants E122W. (b) Localisation de la Glu122 dans le récepteur β_2 adrénergique. Potentiel : -50 mV.

β_2 -K-62-25 et β_2 E122W-K-62-25, et de β_2 -K-73-25 et β_2 E122W-K-73-25. Il s'avère que, pour β_2 -K-62-25 et β_2 E122W-K-62-25, les EC_{50} sont assez proches (155 nM et 247 nM respectivement, fig. 8.8). La réponse maximale de β_2 E122W-K-62-25 est inférieure à celle de β_2 -K-62-25 (50 % vs 65 %). β_2 -K-73-25, quant à lui, présente une réponse tellement altérée qu'il nous a été impossible de réaliser un ajustement suivant l'équation de Hill. Nous remarquons que l'amplitude maximale passe de 40 % à environ 10 %. Dans le cas de l'ICCR β_2 -K-73-25 le couplage semble être hautement dégradé voire inexistant (fig. 8.8).

8.1.2.4 Discussion

TMD0, protéine accessoire nécessaire à l'adressage des couples β_2 -Kir6.2

Dans le cadre de l'étude des couples β_2 -Kir6.2, nous avons dû trouver un moyen d'augmenter leur expression. La solution la plus efficace s'est avérée être la co-expression de ces constructions avec TMD0, domaine N-ter transmembranaire de SUR1. Au sein du canal K_{ATP} , TMD0 servirait de point d'ancrage de SUR à Kir6.2. L'interaction entre TMD0 et Kir6.2 a été démontrée à plusieurs reprises [46, 20, 81], ceci allant dans le sens de notre observation. De plus, il a été mis en évidence que les canaux formés par Kir6.2 Δ + TMD0 présentent une P_o plus élevée que le canal K_{ATP} . Ceci pourrait être à l'origine d'une partie de l'augmentation de courant basal mesuré dans le cas des couples β_2 -Kir6.2 co-exprimés avec TMD0. En outre, Babenko *et al.* avaient déjà proposé l'effet positif de TMD0 sur l'expression de surface de Kir6.2 [20]. Ainsi, TMD0 pourrait faire office de chaperonne pour les ICCR basés sur le β_2 , les aidant à se replier correctement et à atteindre la membrane plasmique sans encombre. L'insertion de TMD0 dans le complexe formé par β_2 -Kir6.2 pourrait également modifier la disposition du β_2 par rapport à Kir6.2 et rendre le couplage plus efficace.

La longueur du "linker" est déterminante pour la qualité couplage

Nous avons montré que la réponse à l'agoniste des ICCR basés sur le récepteur β_2 adrénergique était dépendante de la taille du "linker". La construction β_2 -K0-25 n'est pas sensible à l'isoprotérénol tandis que les versions "M2-like" et "D2-like" répondent à l'application de cet agoniste. En outre, nous remarquons que l'amplitude de la réponse observée varie suivant la délétion. Ainsi, β_2 -K-62-25 (forme "M2-like") présente une réponse maximale aux alentours de 65 % tandis que β_2 -K-73-25 ("D2-like") peut présenter une activation maximale de 40 % environ. Ceci témoigne donc du fait que la qualité du couplage varie en fonction de la longueur du "linker" entre β_2 et Kir6.2. Un point étonnant est l'activation observée dans le cas de la forme "D2-like". Le résultat que nous attendions était en fait une inhibition. En effet, la forme "D2-like" de l'ICCR M2-Kir6.2, M2-K-9-25, permet de retrouver le même type de réponse que la construction D2-K0-25 (*i.e.* une inhibition, Moreau *et al.*, en préparation). Ceci confirme donc que la taille du "linker" est déterminante pour, non seulement la qualité du couplage, mais également le profil de réponse observé. La longueur du lien semble modifier le positionnement du GPCR, modulant ainsi le "gating" de Kir6.2 de manière différente. Si le "linker" est trop long, ce qui est le cas de β_2 -K0-25, la disposition du récepteur pourrait entraver la communication avec Kir6.2.

β_2 -Kir6.2, nouveau biocapteur électrique Cette étude nous a permis d'élaborer un nouveau biocapteur électrique, dans la lignée de M2-K0-25 et D2-K0-25. Il est capable de détecter la présence d'agonistes (isoprotérénol, salbutamol), d'antagonistes (alprenolol) spécifiques du récepteur β_2 adrénergique. Il pourrait donc constituer un outil de criblage haut débit dans le cadre de la recherche de médicaments potentiels pouvant agir sur le récepteur β_2 adrénergique. Ce système, de par sa petite taille (nm), semble être tout particulièrement adapté à la création de biopuces. Il serait intégré dans une bicouche lipidique artificielle, la liaison d'un ligand entraînant des modifications de courant facilement mesurables en temps réel. En outre, les expériences effectuées montrent que les propriétés pharmacologiques du récepteur ne sont pas modifiées puisque les EC_{50} mesurées sont cohérentes avec celles trouvées par l'intermédiaire d'autres méthodes. Un bémol pourrait être le fait que nous ne voyons pas de différence d'activation entre l'agoniste total (isoprotérénol) et l'agoniste partiel (salbutamol). Le fait est que le salbutamol et l'isoprotérénol se fixeraient au niveau du même site, engendrant des changements de conformation similaires [151]. Notre système ne semble donc pas être suffisamment sensible pour détecter ces modifications. Une des explications pourrait provenir du fait que Kir6.2 détecte de manière directe, sans intermédiaire, sans amplification, les changements de conformation du récepteur. Il en est de même pour l'agoniste inverse (timolol), qui doit, en théorie, inhiber l'activité constitutive du GPCR. De plus, il a été montré que l'activité constitutive des GPCR est dépendante des systèmes d'expression utilisés [272], ceci pouvant signifier que le récepteur β_2 adrénergique est faiblement actif en absence de ligand, dans l'ovocyte de xénope.

β_2 -Kir6.2, outil de caractérisation fonctionnelle ? Certaines expériences réalisées au cours de cette étude ont laissé se profiler le potentiel des ICCR en tant qu'outil de caractérisation fonctionnelle. Nous avons exploré l'effet d'une mutation stabilisant le récepteur β_2 adrénergique grâce aux couples β_2 -Kir6.2. Dans ce but, nous avons comparé la sensibilité et la qualité du couplage entre les ICCR faisant intervenir le récepteur "sauvage" et le mutant. La comparaison des courbes concentration-réponse de β_2 -K-62-25 et β_2 E122W-K-62-25 suggère que, dans cette dernière construction, le couplage serait un peu moins efficace (50 %) que dans le cas du "sauvage" (65 %). Les EC_{50} restent cependant très proches (β_2 -K-62-25 : 155 nM et β_2 -K-73-25 : 247 nM). La différence est d'autant plus flagrante avec le couple β_2 -K-73-25, qui, lorsqu'il comprend le récepteur muté ne répond plus à l'agoniste. Cette altération du couplage induite par une mutation ponctuelle dans β_2 provoque donc des modifications au niveau du changement de conformation subit par le récepteur. La mutation E122W a pour but de stabiliser le récepteur et ceci se répercute sur sa capacité à moduler le "gating" de Kir6.2. Dans le β_2 "sauvage", la fixation

d'un agoniste entraîne de nombreux changements conformationnels dont certains au niveau de l'hélice V [271]. Une proline (Pro211) se situant dans cette hélice permet, en changeant de conformation, de modifier la courbure de cette dernière. Dans le cas du mutant Glu122Trp, le noyau aromatique de la Trp permettrait de stabiliser, entre autres, cette Pro211 contraignant ainsi le mouvement de l'hélice V [254]. Roth *et al.*, dans leur étude sur ce mutant, avaient effectué des analyses de "binding", ne trouvant pas de différence entre les constantes de dissociation du récepteur "sauvage" et du mutant. De plus, des expériences de mesure du taux d'AMPc ont permis de conclure que le β_2 Glu122Trp était toujours fonctionnel. Grâce à notre système, nous pouvons donc observer de manière quasi directe les effets d'une telle mutation sur la dynamique du récepteur, chose impossible avec les méthodes couramment utilisées. Les ICCR pourraient donc servir d'outil d'étude fonctionnelle de GPCR. A l'opposé, l'utilisation de mutants de GPCR pourraient nous permettre de mieux comprendre le mécanisme de couplage qui a lieu dans les ICCR. Nous avons également voulu constituer un ICCR basé sur le récepteur β_2 T4L (récepteur β_2 adrénergique dont la boucle i3 a été remplacée par le lysozyme T4), qui a été élaboré dans le cadre de la résolution de la structure du récepteur, afin d'en tester la fonctionnalité. Malheureusement, l'expression de cette construction n'était pas suffisante pour la caractériser, et ce, même en présence de TMD0 (courant basal = 0,22 μ A, n=8).

8.1.3 Le couple D3–Kir6.2

8.1.3.1 Construction du couple D3–Kir6.2

Tout comme pour l'élaboration des couples β_2 –Kir6.2, nous avons effectué l'alignement des séquences de M2, D2 et D3 afin de déterminer si D3 présentait une partie C-ter identique, plus courte ou plus longue que celles de M2 et D2. Il s'est avéré que D3 partage environ 50 % d'identité de séquence avec D2 et possède la même longueur C-ter que ce dernier. Ces deux récepteurs ne possèdent pas d'acides aminés supplémentaires après l'hélice H8 (cf. fig. 8.9). La similitude entre D2 et D3 est de bonne augure puisque cela suggère que le couple D3–Kir6.2 pourrait être fonctionnel sans modification de la taille du lien entre le GPCR et le canal. La construction de D3–K0-25 a été réalisée suivant le protocole décrit dans la section 4.2.3.

8.1.3.2 Expression de D3–K0-25

Une fois la protéine de fusion D3–K0-25 construite, nous l'avons exprimée dans l'ovocyte de xénope et avons mesuré les courants grâce à la méthode de double-microélectrodes. Le courant basal, comme expliqué précédemment, est un indicateur du niveau d'expression des canaux ioniques. Dans le cas de la fusion D3–K0-25 le courant de base mesuré est en moyenne de 0,43 μ A ce qui correspond à un taux

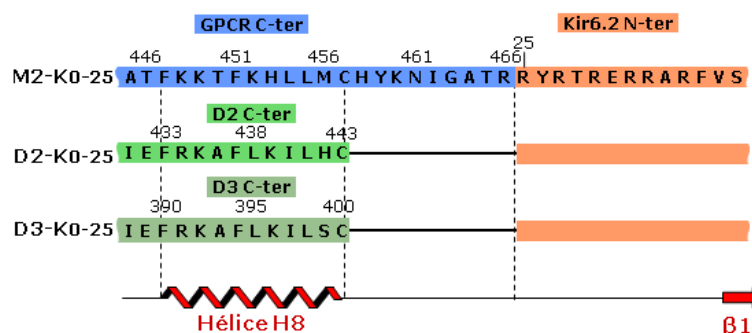


FIGURE 8.9 – Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25 et D3-K0-25.

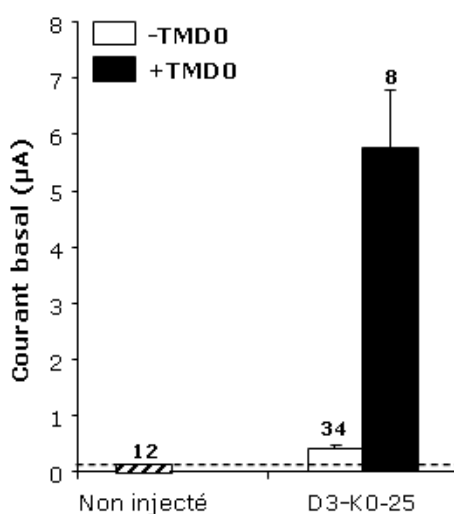


FIGURE 8.10 – Courant basal de la construction D3-K0-25 seul ou en présence de TMD0. Potentiel : -50 mV.

d'expression moyen (fig. 8.10). Dans une optique d'amélioration, nous avons co-exprimé D3-K0-25 et TMD0 et le courant basal mesuré atteint une moyenne de 5,7 μA (fig. 8.10). TMD0 permet d'augmenter d'environ dix fois le courant basal de D3-K0-25, phénomène déjà observé avec les couples β_2 -Kir6.2.

8.1.3.3 Caractérisation de D3-K0-25

Afin de tester la fonctionnalité de D3-K0-25, nous avons utilisé la dopamine. L'ajout de cette dernière à 0,3 μM engendre une diminution du courant d'environ 17 % qui est réversible lorsque le ligand est retiré du milieu (fig. 8.11). Cependant, dans le cas de la fusion co-exprimée avec TMD0, l'application de dopamine 0,3 μM ne donne pas lieu à un changement significatif du courant mesuré (-3 %, fig. 8.11). Le comportement de D3-K0-25 est semblable à celui de D2-K0-25 puisque tous deux

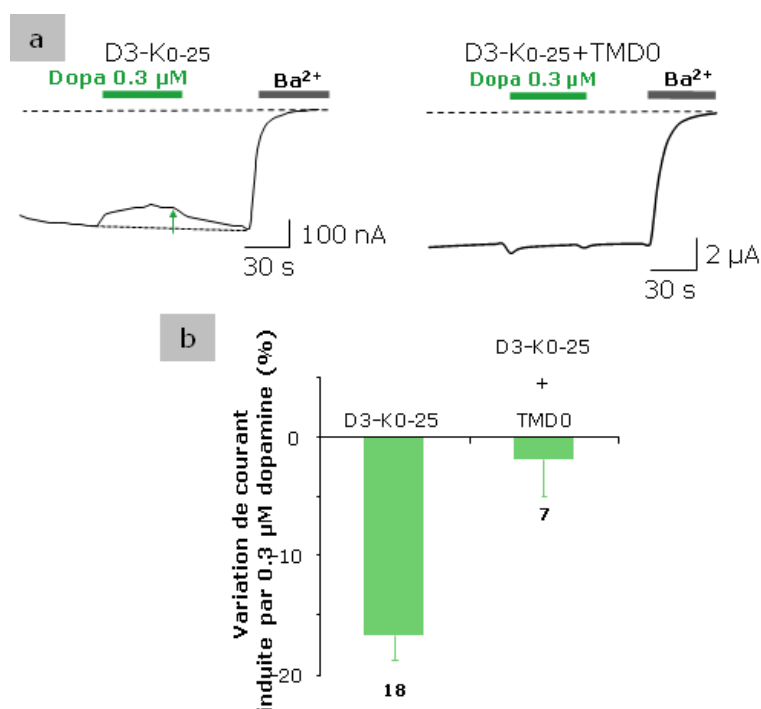


FIGURE 8.11 – Test de fonctionnalité de D3–K0-25. (a) Traces représentatives obtenues en double-microélectrodes. (b) Variation de courant induite par la dopamine à 0,3 µM. Potentiel : -50 mV.

engendrent une inhibition. Ces données pourraient nous apporter des informations quant au mécanisme de couplage entre les GPCR et Kir6.2, nous permettant de comprendre pourquoi le profil de la réponse diffère entre D2–K0-25, D3–K0-25 et M2–K0-25, β_2 –K0-25.

8.1.3.4 Fonctionnalité de D3 au sein de la fusion

Dans le but de déterminer si D3 est toujours fonctionnel (*i.e.* capable d'activer les protéines G) au sein de la fusion, nous utilisons un canal potassique rectifiant entrant activé par les protéines G (Kir3.x). En effet, les GPCR couplés aux protéines $G\alpha_i$ peuvent activer les canaux Kir3.x via les protéines $G\beta\gamma$ (fig. 8.12). Nous nous servons donc de Kir3.x comme d'un rapporteur de l'activité des GPCR. Pour cela, D3–K0-25 et Kir3.x sont co-exprimés dans l'ovocyte de xénope. Cette approche est donc mise en œuvre dans le cas des GPCR couplés $G\alpha_i$. En temps normal, Kir3.4 et Kir3.1 s'associent pour former des hétérotétramères. Ainsi, Kir3.4* est muté (S143T) pour pouvoir être exprimé sans Kir3.1 [319].

L'application de dopamine à 1 µM sur D3–K0-25 + Kir3.4* semble provoquer une légère activation qui est bien inférieure à celles mesurées habituellement avec

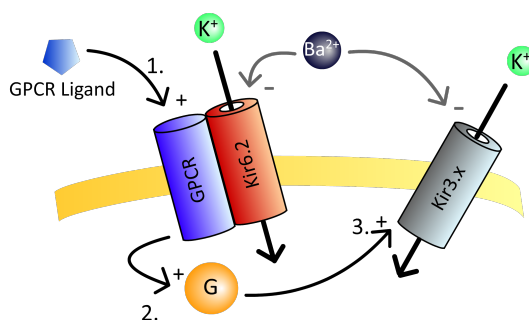


FIGURE 8.12 – Principe du contrôle de fonctionnalité de D3 au sein de la fusion. (1.) Le ligand se fixe sur le GPCR. (2.) Le GPCR est activé et stimule par la suite les protéines G. (3.) Les protéines G induisent l'ouverture du canal potassique Kir3.x. Les canaux Kir6.2 et Kir3.x sont bloqués par le Ba^{2+} .

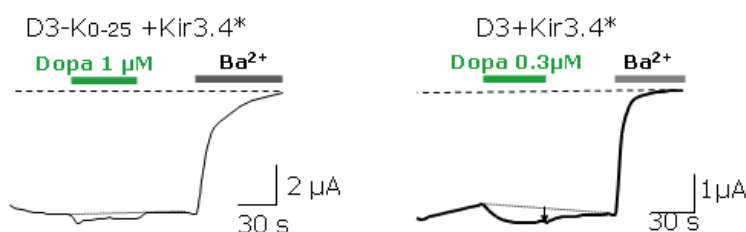


FIGURE 8.13 – Contrôle de fonctionnalité de D3 au sein de la fusion D3–K0-25. Traces représentatives obtenues par la technique de double-microélectrodes. Potentiel : -50 mV.

d'autres GPCR. L'effet observé résulterait en fait de la somme de l'inhibition de D3–K0-25 et de l'activation de Kir3.4*. En outre, en guise de contrôle, nous avons suivi l'effet de l'activation de D3, non fusionné à Kir6.2, sur le courant engendré par Kir3.4*. L'ajout de dopamine $0,3 \mu M$ a pour conséquence une ouverture de Kir3.4* (fig. 8.13). Ces données n'étant pas suffisamment convaincantes, nous ne pouvons pas vraiment conclure quant à la fonctionnalité de D3 lorsqu'il est fusionné à Kir6.2.

8.1.3.5 Discussion

Les résultats obtenus avec la fusion D3–K0-25 sont très encourageants mais restent relativement préliminaires. Pour l'instant, les données montrent que le récepteur dopaminergique D3, lorsqu'il est fusionné à Kir6.2 délété de 25 résidus en N-ter est capable d'inhiber l'activité du canal en réponse à la dopamine. Ceci est très intéressant mécanistiquement parlant étant donné que D2 et D3 partagent environ 50 % d'identité. Les deux récepteurs ont également la même longueur en C-ter. Ces éléments suggèrent que la longueur du lien entre le GPCR et le canal joue un rôle dans le

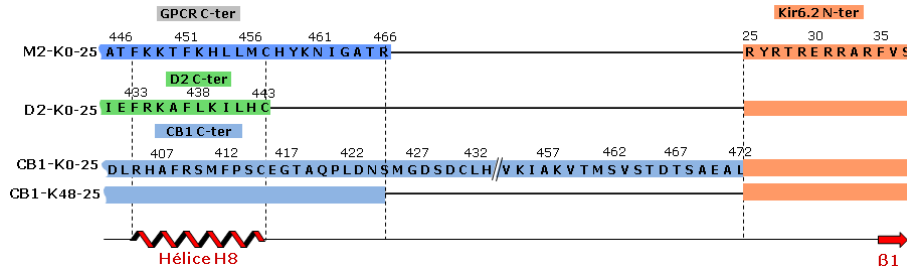


FIGURE 8.14 – Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25 et CB1-Kir6.2.

sens (activation ou inhibition) de la réponse engendrée par la stimulation du GPCR. De plus, il a été montré que lorsque le récepteur M2 est raccourci de neuf résidus, atteignant ainsi la taille de D2, le profil de la réponse est inversé [Moreau *et al.*, en préparation]. De la même manière, l'ajout des neuf résidus C-terminaux de M2 en C-ter de D2 fusionné à Kir6.2 permet de modifier le sens de la réponse induite suite à l'ajout de dopamine [Moreau *et al.*, en préparation]. Un effet surprenant est celui de la co-expression de D3-K0-25 et TMD0 qui augmente très efficacement (dix fois) le courant basal mais abolit l'effet induit par l'activation de D3. Ce phénomène avait déjà été observé avec le couple D2-K0-25. TMD0 étant connu pour augmenter la P_0 de Kir6.2 [20, 81, 46] et également l'expression de surface, nous pouvons supposer que l'abolition de l'inhibition résulte de la somme de ces deux effets. En effet, il est tout à fait plausible que le fait d'avoir plus de canaux à la P_o élevée à la membrane atténue fortement cette inhibition. Enfin, des expériences complémentaires sont en cours ou à faire : doses-réponse de dopamine afin d'évaluer la sensibilité de D3-K0-25, test de U-99194(antagoniste), reproduire les mesures effectuées avec Kir3.4*...

8.1.4 Le couple CB1-Kir6.2

8.1.4.1 Construction de CB1-Kir6.2

La fusion CB1-K0-25 a été mise au point suivant le même mode opératoire que les deux précédentes. CB1 est un GPCR différent de M2, D2, β_2 , D3 car il possède une extrémité N-ter qui compte une centaine de résidus. Dans le but de montrer que le concept d'ICCR est généralisable aux GPCR de classe A, nous avons choisi CB1 qui est relativement éloigné des GPCR utilisés jusqu'à lors (23,3 % d'homologie avec D2 et 27,7 % d'homologie avec M2). Une construction supplémentaire, faisant intervenir CB1 Δ C48 a été réalisée (forme "M2-like", fig. 8.14), espérant ainsi pouvoir améliorer la qualité du couplage entre CB1 et Kir6.2. De plus, CB1 est couplé aux protéines $G\alpha_i$, ce qui nous permet de mettre en œuvre les tests de fonctionnalité faisant intervenir Kir3.4*.

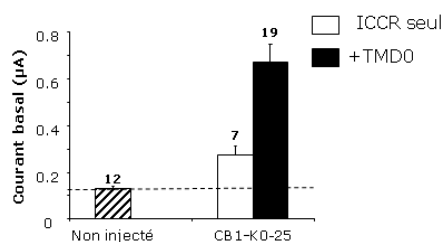


FIGURE 8.15 – Courants de base de CB1-K0-25 et CB1-K0-25 + TMD0. Potentiel : -50 mV.

8.1.4.2 Expression de CB1-K0-25

Le courant basal engendré par CB1-K0-25 ($0,3 \mu\text{A}$, fig. 8.15) révèle que cette construction possède un taux d'expression faible (environ deux fois le courant basal d'un ovocyte non injecté). Comme décrit précédemment, nous avons co-exprimé CB1-K0-25 et TMD0 en espérant augmenter le courant de base et, par la même, le niveau d'expression. Le courant mesuré pour CB1-K0-25 + TMD0 se situe aux alentours de $0,7 \mu\text{A}$. Ainsi, la présence de TMD0 a permis de multiplier par quasiment 2,5 le courant basal de cette construction. Encore une fois, TMD0 confirme son rôle d'amplificateur d'expression.

8.1.4.3 CB1-K0-25 est-il fonctionnel ?

La fonctionnalité du couplage entre CB1 et Kir6.2 a été testée avec W102, un ligand de CB1. L'ajout de W102 à $1 \mu\text{M}$ n'induit pas de changement de courant significatif sur CB1-K0-25 (5,7 %, fig. 8.16). Cependant, en présence de TMD0, l'application de W102 $1 \mu\text{M}$ met en évidence une activation de l'ordre de 35 % (fig. 8.16). Cette activation est partiellement réversible. TMD0 permettrait non seulement d'améliorer le niveau d'expression de cet ICCR mais aiderait également à sa fonction d'une manière pour l'instant inconnue. Des données obtenues au laboratoire ont montré un phénomène semblable avec la construction M2-K0-30(Kir6.2 délété de 30 résidus en N-ter) qui n'est pas fonctionnelle lorsqu'elle est exprimée mais seule mais le devient en présence de TMD0 (activation par l'acétylcholine, données non publiées).

8.1.4.4 Fonctionnalité de CB1 au sein de la fusion

Pour nous assurer que CB1 a bien conservé sa capacité à activer les protéines G hétérotrimériques tout en étant fusionné à Kir6.2. Nous avons utilisé le canal rapporteur Kir3.4* qui est activé par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines $G\alpha_i$. Dans un premier temps, nous avons vérifié que Kir3.4* était bien activé par CB1 non fusionné,

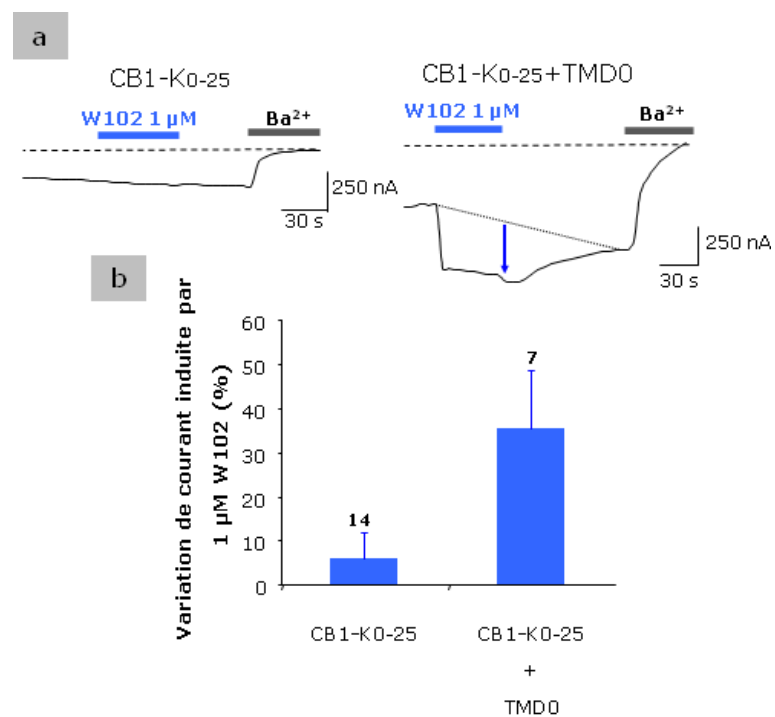


FIGURE 8.16 – Fonctionnalité du couple CB1–K0-25 testée en présence de W102 à 1 μ M. (a) Traces représentatives obtenues par la méthode de double-microélectrodes. (b) Variation de courant induite par W102 à 1 μ M. Potentiel : -50 mV.

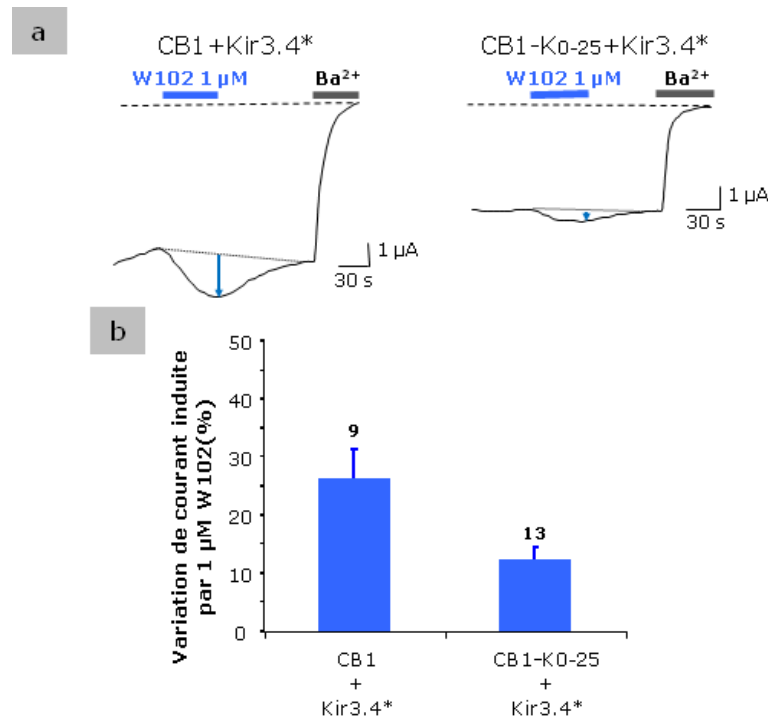


FIGURE 8.17 – Intégrité de la fonction de CB1 dans le couple CB1–K0-25. (a) Traces représentatives obtenues par la méthode de double-microélectrodes. (b) Variation de courant induite par W102 à 1 μ M. Potentiel : -50 mV.

dans l'ovocyte de xénope. La variation de courant induite par le W102 à 1 μ M s'élève à +26 % (fig. 8.17). La liaison de W102 sur le CB1 au sein de la fusion active Kir3.4* aux alentours de 15 % (fig. 8.17). Il semblerait que CB1 lié à Kir6.2 ait quelque peu perdu sa capacité à communiquer avec les protéines G.

8.1.4.5 Discussion

CB1–K0-25 est un nouvel exemple montrant l'efficacité de TMD0 en tant que promoteur d'expression des ICCR. Contrairement à D3–K0-25, celui-ci est fonctionnel uniquement en présence de TMD0 suggérant que ce dernier puisse tenir un rôle supplémentaire, de nature fonctionnelle. De plus, CB1 lié à Kir6.2 semble avoir perdu sa capacité à activer les protéines G hétérotrimériques. Ceci signifierait que la partie C-ter du récepteur, engagée avec le N-ter de Kir6.2 est importante pour l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. Il a été montré, en utilisant un peptide constitué des acides aminés 401 à 417 de CB1, que ce domaine était impliqué dans cette interaction [126, 209]. Ainsi, le fait que le C-ter de CB1 soit lié de manière covalente à Kir6.2 peut changer la conformation ou encombrer stériquement le site de liaison, bloquant, de cette façon, l'accès des protéines G hétérotrimériques. De plus,

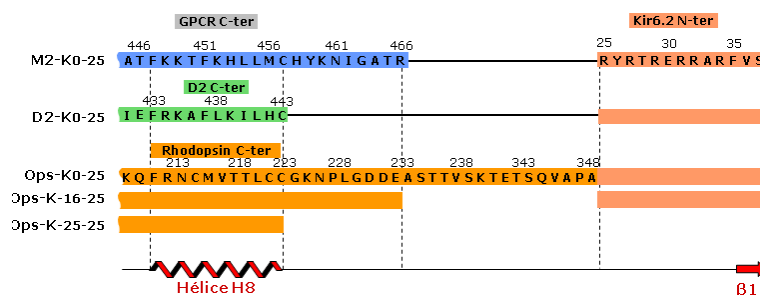


FIGURE 8.18 – Alignement de la zone de fusion des ICCR M2-K0-25, D2-K0-25, ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25.

il serait éventuellement possible d'améliorer la réponse induite par le ligand grâce au mutant CB1 Asp163Asn [220]. Ce mutant aurait une activité constitutive diminuée, laissant supposer que l'activation observée avec notre système pourrait être d'autant plus importante.

8.1.5 Le couple opsine-Kir6.2

8.1.5.1 Construction des couples ops-Kir6.2

Le clone de l'opsine a été dans un premier temps sous-cloné du vecteur pMT4 au vecteur pGH2 avec l'enzyme de restriction EcoRI. La fusion a ensuite été effectuée suivant le mode opératoire décrit section 4.2.3. Trois couples ops-Kir6.2 ont été réalisés dans le but d'optimiser la communication entre les deux protéines : ops-K0-25, ops-K-16-25 (la forme "M2-like"), ops-K-25-25 ("D2-like") (cf. fig. 8.18).

8.1.5.2 Comment tester la fonctionnalité de l'opsine en ovocyte de xénope et TEVC ?

Dans le cadre de l'évaluation de la fonctionnalité des couples ops-Kir6.2, nous nous sommes heurtés à une première difficulté qui réside dans le fait que l'opsine est activée par les photons (cf. section 2.5.4). En effet, il nous semblait délicat d'effectuer des expériences en double-microélectrodes en respectant les conditions d'activation de l'opsine (*i.e.* obscurité puis lumière). Grâce à une recherche bibliographique approfondie, nous avons trouvé qu'il était possible d'activer partiellement l'opsine, sans stimulation lumineuse, en utilisant le produit de la photo-isomérisation du rétinol 11-cis, le rétinol tout-trans [136, 256]. Afin de tester la capacité de ce dernier à activer l'opsine dans l'ovocyte de xénope, nous avons utilisé le canal activé par les protéines G, Kir3.1F137S (noté Kir3.1*). L'activation de ce canal par l'opsine n'était, au premier abord, pas évidente puisque celle-ci est couplée à un type de protéines G

(transducine) exprimé exclusivement dans les cellules de la rétine. De plus, il n'existe aucune preuve de la présence de telles protéines G dans l'ovocyte de xénope. Cependant, il semble que l'opsine soit capable d'interagir avec d'autres types de protéines G comme $G\alpha_i$ [306, 147].

Par conséquent, nous avons utilisé le rétinol tout-trans comme un ligand classique, levant ainsi les difficultés liées à l'activation par la lumière. Ainsi, comme montré en fig. 8.19, l'application de rétinol tout-trans (noté *atret*) à 5 μM active Kir3.1* à 275 % et à 10 μM à plus de 330 %. Ces deux activations ne sont cependant pas significativement différentes. Il est à noter que la cinétique de réponse est très lente comparée à celle observée suite à l'activation de Kir3.1* par d'autres GPCR. Une des explications possibles est le fait que le rétinol tout-trans est un composé hydrophobe qui aurait tendance à s'accumuler dans la membrane. Etant quelque peu sceptiques quant à la réponse mesurée, nous avons effectué des contrôles afin de nous assurer que l'effet observé était bien dû à l'activation de l'opsine par le rétinol tout-trans. Pour ce faire, nous avons utilisé la sous-unité catalytique S1 de la toxine pertussique (PTX), connue pour bloquer la dissociation de α et $\beta\gamma$ des protéines G par ADP-ribosylation de la sous-unité α_i . L'application de rétinol tout-trans à 5 et 10 μM sur les ovocytes exprimant l'opsine, Kir3.1* et la PTX n'engendre aucune réponse (fig. 8.19). Nous pouvons donc en déduire que l'activation de Kir3.1* suite à l'application du rétinol tout-trans est due à l'activation, par l'opsine, de protéines G hétérotrimériques sensibles à la PTX. Nous avons effectué un contrôle sur Kir3.1* seul, pour éliminer l'hypothèse de l'effet non spécifique du composé ou du solvant sur Kir3.1*. Le rétinol tout-trans étant un composé hydrophobe, il doit être dissous dans l'éthanol 100 %. Or, il a été montré qu'il existait une poche de liaison de l'éthanol sur certains canaux Kir3.x [12]. Les résultats montrent que l'application de rétinol tout-trans à 5 μM ou 10 μM sur Kir3.1* seul n'induit pas d'augmentation de courant (cf. fig. 8.19). De plus, la concentration en éthanol dans les solutions de perfusion est trop faible (au maximum 17 mM) et ne correspond pas à celles nécessaires à l'activation des canaux Kir3.x dans les résultats présentés par Aryal *et al.*. Afin de déterminer l' EC_{50} du rétinol tout-trans, nous l'avons testé de 0,05 μM à 10 μM (concentrations intermédiaires : 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM et 5 μM). En plus de la cinétique d'activation très lente, nous avons observé un effet inattendu : le canal est activé à son maximum à 5 μM , sans transition (fig. 8.21). En d'autres termes, nous ne voyons pas d'activation progressive de Kir3.1* lorsque la concentration augmente. Nous avons alors testé les concentrations suivantes : 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM et 10 μM en espérant mesurer une activation progressive entre 1 et 5 μM . Le fait est que l'activation maximale est encore une fois obtenue de manière abrupte, à 3 μM (fig. 8.21 et fig. 8.22).

Nous avons de plus effectué un contrôle avec l'hydroxylamine, composé permet-

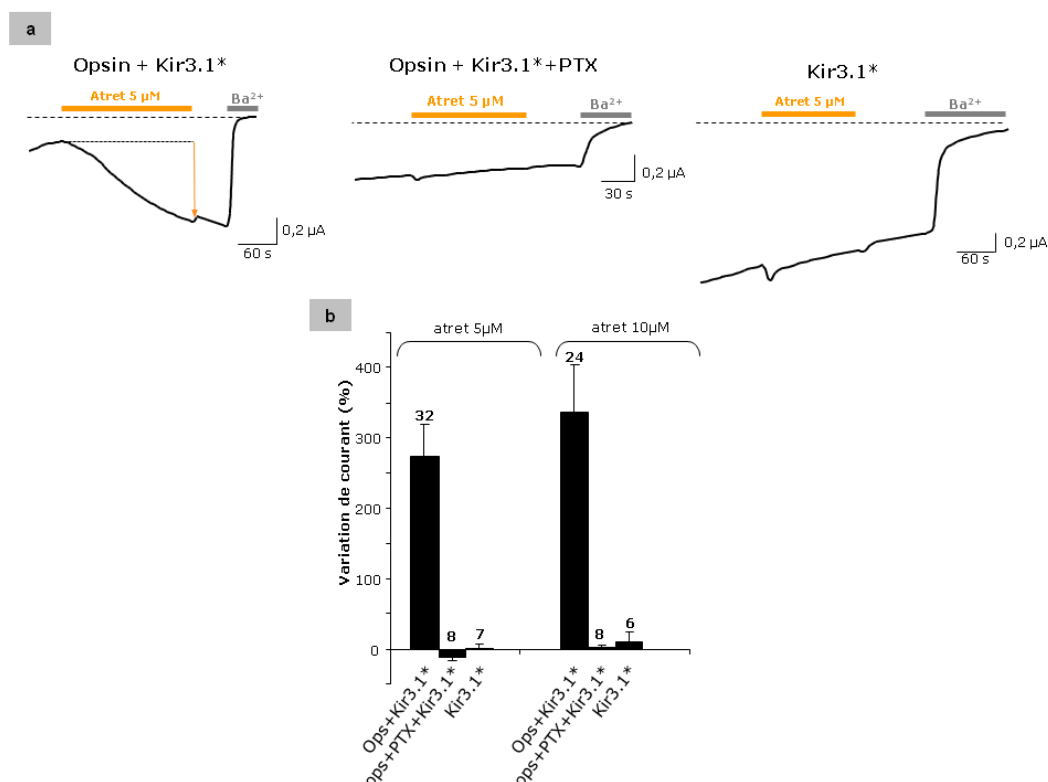


FIGURE 8.19 – Activation de l’opsine par le rétinol tout-trans (noté atret). (a) Enregistrements représentatifs obtenus par la technique de double micro-électrodes. (b) Le rétinol tout-trans, à 5 μ M induit une activation de Kir3.1* d’environ 275 % tandis que le même composé à 10 μ M provoque une activation de 337 %. La co-expression de la PTX abolit cette activation pour les deux concentrations de rétinol tout-trans. Le rétinol tout-trans ou l’éthanol dans lequel il est dissous n’ont pas d’effet sur Kir3.1 seul. Potentiel : -50 mV.

tant d’inactiver l’opsine interagissant avec le rétinol tout-trans (fig. 8.20). L’application d’hydroxylamine à 10 mM, sans ajout préalable de rétinol tout-trans n’induit pas de modification significative du courant engendré par Kir3.1*. En revanche, après application de rétinol tout-trans, nous observons une inhibition correspondant à l’ajout d’hydroxylamine. Cette inhibition est réversible, phénomène surprenant qui pourrait s’expliquer de deux manières :

- le rétinoldoxime, produit de la réaction entre le rétinol tout-trans et l’hydroxylamine, s’hydrolyse pour redonner du rétinol tout-trans,
- du fait de son caractère hydrophobe, du rétinol tout-trans s’accumule dans la membrane et active l’opsine suite au lavage de l’hydroxylamine.

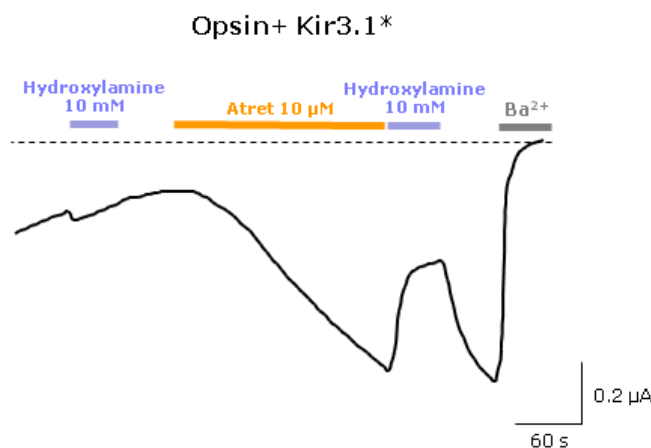


FIGURE 8.20 – Effet de l’hydroxylamine 10 mM sur l’activation induite par le rétinale tout-trans 5 μ M. Potentiel : -50 mV.

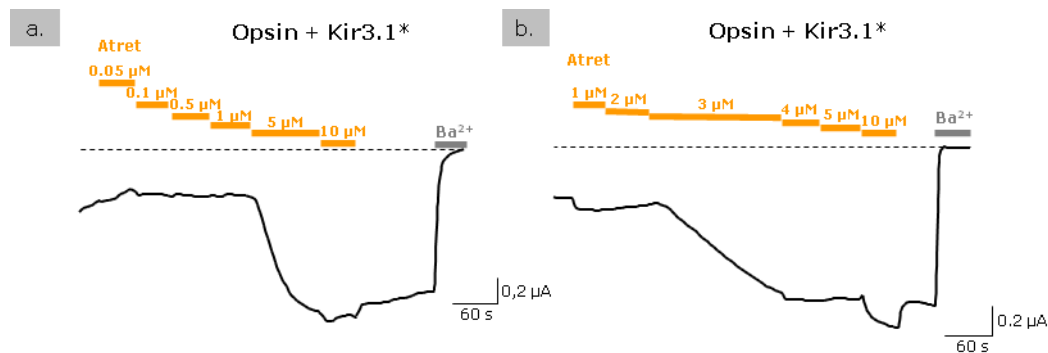


FIGURE 8.21 – Traces représentatives obtenues en TEVC de dose-réponse de rétinale tout-trans. (a) Dose-réponse effectuée entre 0,05 μ M et 10 μ M. Le maximum d’activation est atteint sans transition, à 5 μ M. (b) Dose-réponse réalisée avec les concentrations suivantes : 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M et 10 μ M. L’activation maximale est obtenue à une concentration de 3 μ M sans passer par des paliers. Potentiel : -50 mV.

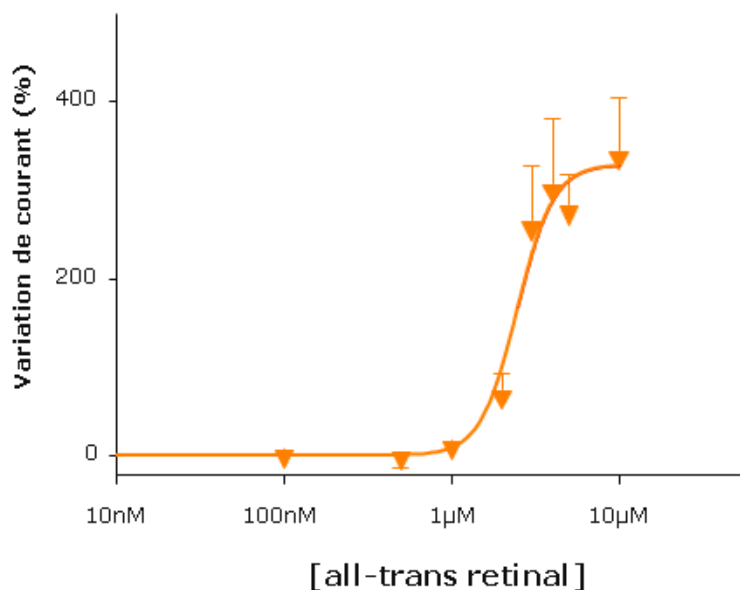


FIGURE 8.22 – Courbe dose-réponse de rétinol tout-trans sur opsin + Kir3.1*. L'ajustement a été réalisé avec l'équation de Hill la plus proche des résultats obtenus. $EC_{50} = 2,5 \mu M$, $h=4$. Potentiel : -50 mV.

8.1.5.3 Expression des couples ops-Kir6.2

Comme pour tous les ICCR, nous évaluons leur capacité à atteindre la membrane plasmique en mesurant le courant basal. Les courants de base détectés dans le cas de l'ops-K0-25, l'ops-K-16-25 et l'ops-K-25-25 ne sont pas suffisamment élevés pour que nous puissions caractériser ces constructions. Nous avons donc co-exprimé TMD0 avec ces trois ICCR dans le but d'en augmenter l'expression de surface. Dans le cas de l'ops-K0-25 le courant de base passe de $0,8 \mu A$ à environ $1,7 \mu A$ (fig. 8.23). Pour la construction ops-K-16-25 seule, le courant basal avoisine les $0,5 \mu A$ tandis que l'ajout de TMD0 permet d'atteindre $1,4 \mu A$ (fig. 8.23). Enfin, aucune mesure n'a pu être effectuée avec ops-K-25-25 car les courants étaient bien trop faibles (équivalents à ceux d'ovocytes non-injectés). Cependant, l'ajout de TMD0 nous a permis d'arriver à un courant de $4,7 \mu A$ (fig. 8.23). De nouveau, TMD0, probablement en interagissant avec Kir6.2, promeut l'expression d'ICCR. Nous avons donc décidé de tester la fonctionnalité des couples ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25 co-exprimés avec TMD0.

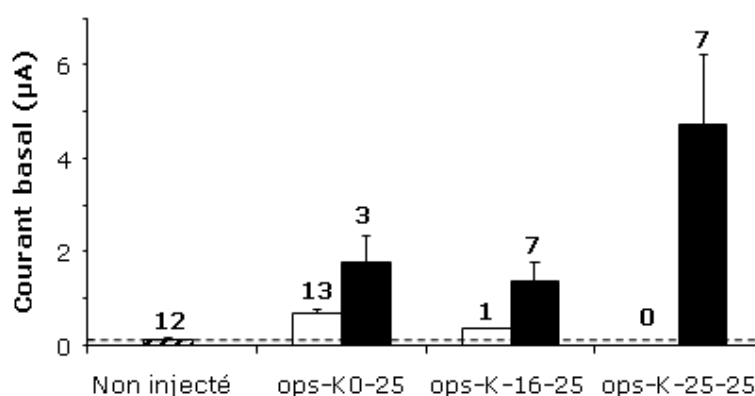


FIGURE 8.23 – Courants de base des constructions ops-K0-25, ops-K-16-25 et ops-K-25-25 \pm TMD0. Potentiel : -50 mV.

8.1.5.4 Fonctionnalité des couples ops-Kir6.2

Ayant réussi à montrer que le rétinol tout-trans est capable d'activer l'opsine dans l'ovocyte de xénope, nous avons pu nous atteler au test de la fonctionnalité des fusions ops-Kir6.2. L'application de rétinol tout-trans sur ops-K0-25 \pm TMD0 ne conduit à aucune réponse. Le couplage entre l'opsine et Kir6.2 ne semble donc pas être fonctionnel. Nous avons ensuite testé les formes "M2-like" et "D2-like" de l'ops-Kir6.2 (ops-K-16-25 et ops-K-25-25 respectivement). Nous avons rencontré quelques difficultés liées à l'expression des constructions et les avons testées en présence de TMD0. Le fait est que nous n'observons pas d'activation suite à l'application du rétinol tout-trans, ni dans le cas de l'ops-K-16-25 + TMD0 ni dans le cas l'ops-K-25-25 + TMD0. Les traces obtenues en TEVC avec cette dernière construction ressemblent à celles du D3-K0-25 + TMD0 (cf section 8.1.3.3, fig. 8.24). Cela laisse à penser que, exprimé seul, ops-K-25-25 pourrait présenter une inhibition, ce qui serait logique puisqu'il s'agit de la forme "D2-like". Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer la nature de la réponse de ce couple.

8.1.5.5 Fonctionnalité de l'opsine au sein des fusions

Tout comme avec les couples CB1-K0-25, D3-K0-25, nous avons testé la fonctionnalité de l'opsine au sein des constructions ops-Kir6.2, et ce, avec le canal Kir3.1*. L'ajout de rétinol tout-trans sur ops-K0-25 a pour conséquence l'activation de Kir3.1* aux alentours de 150 % (fig. 8.25). Nous pouvons en déduire que, malgré le fait que la fusion ne soit apparemment pas fonctionnelle, l'opsine est toujours capable d'activer les protéines G hétérotrimériques au sein de celle-ci. Les tests réalisés avec ops-K-16-25 nous informent que l'opsine communique avec les protéines G (activation de 87 %) et par la même, que la délétion de seize résidus en C-ter n'af-

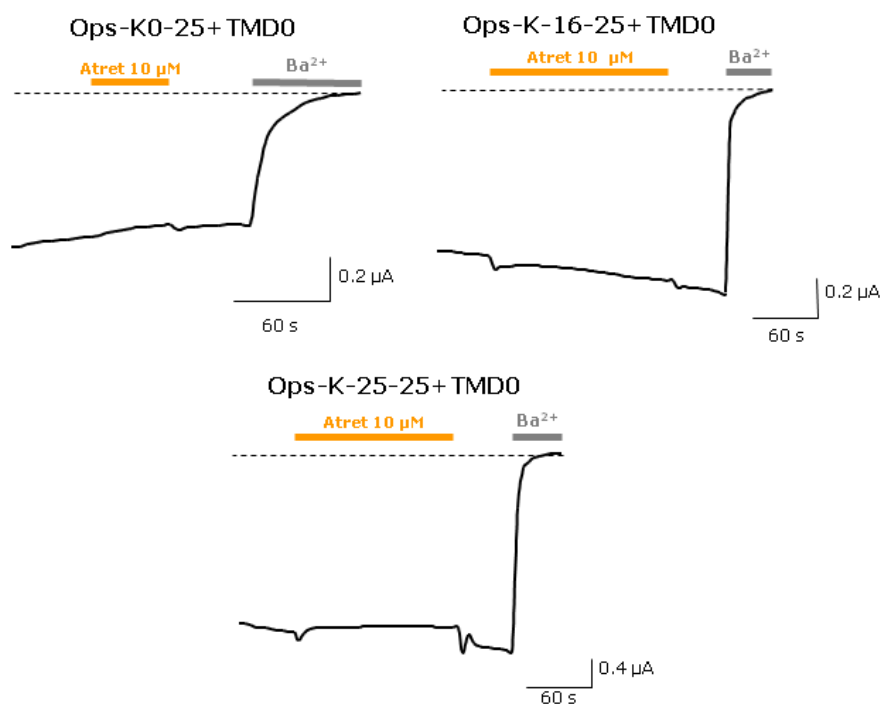


FIGURE 8.24 – Enregistrements représentatifs obtenus en TEVC sur ops-K0-25 + TMD0, ops-K-16-25 + TMD0 et ops-K-25-25 + TMD0. Comportement observé lors de l'application du rétinol tout-trans à 5 μM pour ops-K0-25 + TMD0 et à 10 μM pour ops-K-16-25 + TMD0 et ops-K-25-25 + TMD0. Potentiel : -50 mV.

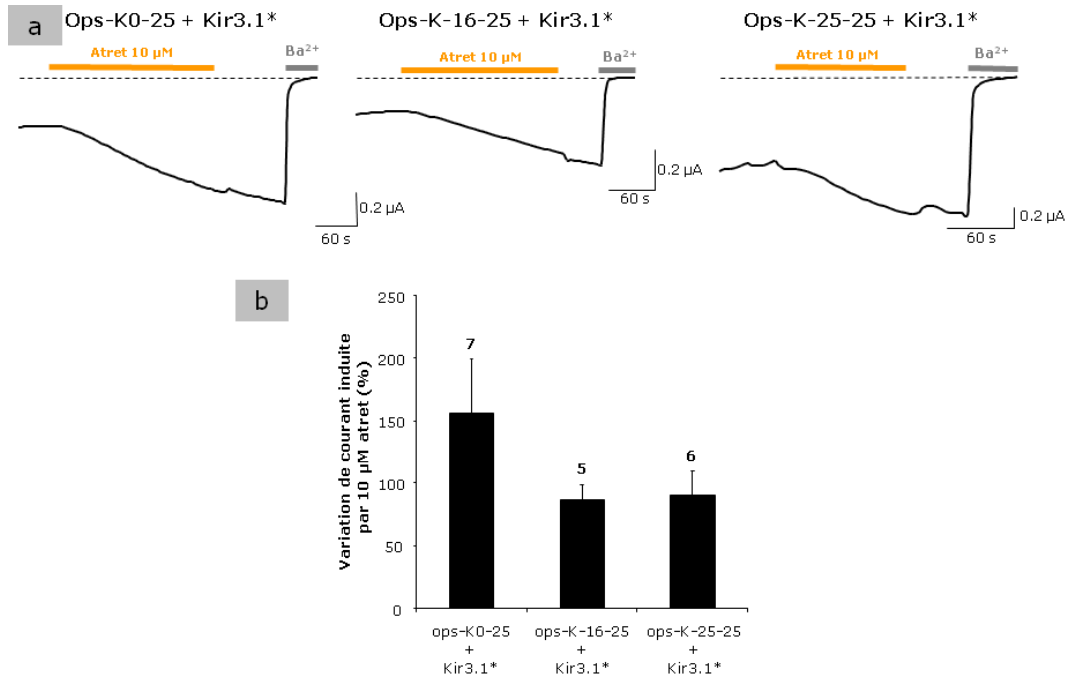


FIGURE 8.25 – Tests de fonctionnalité de l’opsine au sein des fusions ops-K0-25, ops-k-16-25 et ops-K-25-25. (a) Traces représentatives enregistrées en TEVC. (b) Variation induite par le rétinol tout-trans à 10 μ M. Potentiel : -50 mV.

fecte pas sa fonctionnalité. L’opsine déletée de 25 résidus en C-ter dans la fusion ops-K-25-25 peut activer Kir3.1* de l’ordre de 90 % en réponse à l’application de rétinol tout-trans à 10 μ M (fig.8.25). Il semblerait donc que la délétion ou la combinaison de la délétion et de la fusion altère la capacité de l’opsine à communiquer avec les protéines G. Un contrôle est en cours de mise au point pour déterminer la cause de cette perte d’activation (élaboration des ops Δ C16 et ops Δ C25).

8.1.5.6 Discussion

Le rétinol-tout trans peut activer l’opsine en ovocyte de xénope Dans le cadre de la mise au point de l’ICCR ops-Kir6.2, nous devons trouver un moyen de tester la fonctionnalité du couple sans devoir effectuer une partie des expériences dans l’obscurité. L’opsine étant un GPCR activé par les photons, il était nécessaire, pour des raisons expérimentales, de s’affranchir de la stimulation lumineuse. Pour ce faire, nous avons utilisé le rétinol tout-trans qui est le produit de la photoisomérisation du rétinol 11-cis. L’effet de ce composé sur l’opsine a déjà été démontré auparavant sur membranes issues de tissus natifs [136, 256]. Afin de pouvoir évaluer l’effet du rétinol tout-trans, nous avons besoin d’un système rapporteur de cette activation. Pour cela, nous avons mis à contribution le canal Kir3.1*, activé par les protéines G hété-

rotrimériques (sous-unités $\beta\gamma$ couplées $G\alpha_i$). Nous observons donc que la liaison du rétinol tout-trans sur l'opsine est capable d'engendrer une activation de Kir3.1* de l'ordre de 250 % (à 5 et 10 μM). Ceci signifie, non seulement, que le rétinol tout-trans peut activer l'opsine lorsque celle-ci est exprimée en ovocytes de xénope, mais aussi que l'opsine y est couplée aux protéines $G\alpha_i$. Dans les bâtonnets de la rétine, l'opsine interagit avec la transducine, une protéine $G\alpha$ se trouvant uniquement dans ce tissu. Quelques expériences, impliquant des chimères de protéines $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q$ [306] ou reposant sur la ressemblance existant entre la transducine et $G\alpha_i$ [147], appuient cette observation. Le contrôle consistant à co-exprimer la sous-unité catalytique de la PTX avec l'opsine et Kir3.1* n'est sujet à aucune activation. Ce résultat confirme que l'opsine est couplée aux protéines $G\alpha_i$ dans l'ovocyte de xénope. De plus, la cinétique de l'activation de Kir3.1* est plus lente que celle observée habituellement (160 s en moyenne pour une concentration de 5 μM , $n=13$) avec d'autres ligands et d'autres GPCR (effet quasi instantané). Une des possibilités pouvant être à l'origine de cette cinétique particulière est le caractère hydrophobe du rétinol tout-trans. En effet, ce dernier pourrait en quelque sorte s'accumuler dans la membrane ralentissant ainsi la cinétique d'activation de l'opsine. Une seconde option repose sur la structure quaternaire de l'opsine dans la membrane de l'ovocyte de xénope qui pourrait ne pas être appropriée pour assurer une activation optimale des protéines G. Il a été montré que l'opsine, dans les tissus natifs, est organisée en dimères qui s'associent entre-eux en rangées parallèles [85, 169]. En outre, il a été mis en évidence que l'utilisation de détergents présentant des chaînes carbonées de différentes tailles pouvait influencer la formation de ces structures quaternaires [139]. Ainsi, le n -dodécyl- β -D-maltoside (DDM) empêche la formation d'oligomères d'opsine de grande taille tandis que le n -hexadécyl- β -D-maltoside (HDM) favorise leur formation (observations en microscopie électronique à balayage). De plus, la mesure de l'activation de la transducine par fluorescence à 345 nm montre que la cinétique est plus lente en DDM qu'en HDM [139]. Ceci suggère donc que l'état d'oligomérisation de l'opsine a un effet sur la cinétique d'activation de la transducine. Dans notre cas, nous pouvons supposer que l'arrangement des récepteurs dans la membrane d'ovocyte de xénope n'est pas optimal (à cause de la composition de la membrane plasmique), expliquant ainsi le temps nécessaire à la mesure de l'activation maximale. Un autre point est le caractère irréversible de l'activation induite par le rétinol tout-trans. En effet, nous ne parvenons pas à éliminer le ligand par simple lavage. Il semblerait que celui-ci soit emprisonné dans son site de fixation, conférant à l'opsine un état activé permanent. Une explication plausible trouve sa source dans le cycle visuel. Suite à la photoisomérisation du rétinol 11-cis en rétinol tout-trans, une faible proportion de ce dernier peut sortir librement de son site tandis que le reste doit être pris en charge par une déshydrogénase (rétinol déshydrogénase) qui réduit le rétinol tout-trans en rétinol

lui permettant de quitter son site de liaison [162]. De cette manière, il y a très peu de rétinol libre pouvant potentiellement activer l'opsine, et ce, indépendamment de l'illumination. Si c'était le cas, ceci pourrait fortement entraver la vision.

Le profil de dose-réponse du rétinol tout-trans est atypique Comme le montre la figure 8.21, le comportement de la courbe dose-réponse de rétinol tout-trans est pour le moins inhabituel. Le fait est que l'activation observée ne se produit pas de manière graduelle mais brutale, passant d'un Kir3.1* non activé à une activation maximale entre 1 et 5 μM . La dose réponse effectuée entre 1 et 5 μM nous montre qu'un phénomène semblable est observable entre 2 et 3 μM . Cela sous-entend, soit une forte coopérativité entre les monomères d'opsine due à la structure quaternaire de ce GPCR, soit un effet dû au caractère hydrophobe du rétinol tout-trans. Dans le premier cas de figure, certaines observations par microscopie à force atomique laissent entendre que l'opsine aurait tendance, dans les tissus natifs, à former des rangées de dimères, interagissant avec d'autres rangées de dimères de manière parallèle [85, 169]. Nous pouvons donc supposer que cet arrangement joue un rôle dans la fonction de l'opsine et une telle promiscuité suggère un phénomène de coopérativité. Le profil de dose-réponse du rétinol tout-trans que nous observons montre que le coefficient de Hill est élevé ($h=4$, fig. 8.22) ce qui impliquerait que la fixation d'une molécule de rétinol tout-trans influence grandement la liaison des autres. L'autre explication repose sur l'hydrophobicité du ligand. Il pourrait en effet présenter un profil de diffusion dans la membrane particulier, tendant à s'accumuler dans la membrane et déplaçant ainsi la concentration ayant un effet maximal.

TMD0 améliore l'expression des couples ops-Kir6.2 Comme avec les autres ICCR, nous avons utilisé TMD0 dans le but d'augmenter leur expression de surface. La méthode s'est avérée efficace sur ces ICCR, nous confortant dans l'idée que TMD0, en interagissant avec Kir6.2, facilite l'adressage à la membrane des ICCR. Le courant basal de ops-K0-25 est quasiment doublé. TMD0, premier domaine transmembranaire de SUR1 jouerait donc un rôle de chaperonne pour les ICCR leur permettant d'atteindre la membrane plasmique en plus grand nombre. Il a été montré que TMD0, lorsqu'il est co-exprimé avec Kir6.2 Δ , augmente la P_o du canal. Ainsi, nous pouvons avancer qu'une partie de l'augmentation du courant basal observée est due à une probabilité d'ouverture plus élevée de Kir6.2.

Les fusions ops-Kir6.2 ne sont pas fonctionnelles en présence de TMD0 Les tests effectués avec les couples ops-Kir6.2 en présence de TMD0 nous amènent à penser que les fusions ne sont pas fonctionnelles. En effet, l'ajout de rétinol tout-trans à 5 ou 10 μM ne provoque pas de modification de courant. Ainsi, il semblerait

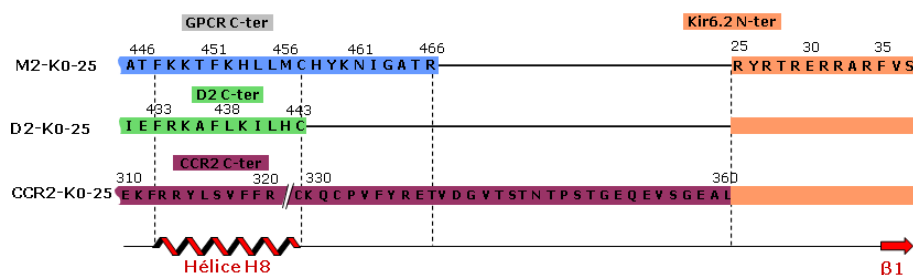


FIGURE 8.26 – Alignement de la zone de fusion de M2-K0-25, D2-K0-25, CCR2-K0-25.

nécessaire d'effectuer une optimisation de ces couples. Une des pistes à suivre serait celle de la stabilité de l'opsine. Ce GPCR est connu pour être l'un des plus stables et le passage de la conformation inactive à active ne met en jeu que de subtiles changements conformationnels [122]. Nous pouvons donc supposer que les modifications structurales ne sont pas suffisantes pour être transmises à Kir6.2. Une solution serait donc d'effectuer la manipulation inverse à celle réalisée avec le récepteur β_2 adrénergique (mutant Glu122Trp). La position de ce résidu est équivalente à celle du Trp126 dans la rhodopsine. L'idée serait donc de remplacer le Trp par une Glu afin de rendre l'opsine plus flexible. Nous avons pu remarquer, dans le cas des ICCR basés sur le mutant β_2 Glu122Trp que la réponse à l'isoprotérénol était altérée par rapport aux ICCR faisant intervenir le β_2 sauvage. La mutation inverse Trp126Glu pourrait éventuellement rendre l'opsine plus flexible et améliorer la transmission des changements conformationnels, induits par la fixation du rétinol tout-trans, à Kir6.2.

8.1.6 Le couple CCR2-Kir6.2

8.1.6.1 Construction du couple CCR2-K0-25

Sur le même principe que les constructions précédentes, nous avons élaboré la fusion CCR2-K0-25 suivant la méthode décrite dans la section 4.2.3. Sur l'alignement avec M2 et D2, nous remarquons que l'hélice H8 de CCR2 est plus longue de 7 résidus (fig. 8.26).

8.1.6.2 Expression de CCR2-K0-25

Avant de pouvoir tester la fonctionnalité du couple, nous devons au préalable vérifier l'expression de surface. Pour ce faire, et comme précédemment, nous mesurons le courant basal. Lorsque CCR2-K0-25 est exprimé seul dans l'ovocyte de xénope, nous observons un courant proche de celui d'ovocytes non injectés (environ 0,15 μ A, fig. 8.27). Cela n'étant pas suffisant pour caractériser CCR2-K0-25, nous avons adopté la même stratégie qu'avec les autres ICCR et avons co-exprimé CCR2-K0-25 avec

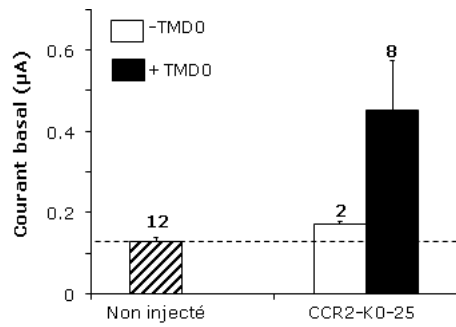


FIGURE 8.27 – Courant de base des constructions CCR2-K0-25 et CCR2-K0-25 + TMD0. Potentiel : -50 mV.

TMD0. Le courant basal est ainsi passé de $0,17 \mu\text{A}$ à $0,45 \mu\text{A}$ (fig. 8.27). Ces expériences ayant été effectuées à une période où les ovocytes étaient de mauvaise qualité, il serait intéressant de les reproduire. TMD0 semble, une fois de plus, un moyen relativement efficace d'augmenter le courant de base et par conséquent l'expression de surface des ICCR.

8.1.6.3 Fonctionnalité de CCR2 au sein de la fusion

Malgré le fait que le courant de base engendré par CCR2-K0-25 soit plus que doublé en présence de TMD0, celui-ci n'était pas suffisant pour tester la fonctionnalité du couple. Nous avons tout de même voulu vérifier la capacité de CCR2 à activer les protéines G hétérotrimériques, seul ou en fusion avec Kir6.2. Pour ce faire, nous avons utilisé un des ligands de CCR2, MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1 aussi appelé CCL2). Ce composé est une chimiokine, peptide de 23 résidus. Comme à l'accoutumée, nous avons co-injecté CCR2 ou CCR2-K0-25 avec Kir3.4*. CCR2 non fusionné à Kir6.2 engendre une activation de Kir3.4* de 283 % tandis que CCR2 au sein de la fusion active le canal aux environs de 125 % (fig. 8.28). Dans les deux cas, CCR2 est capable de communiquer avec les protéines G hétérotrimériques, ceci nous permettant d'en déduire que l'absence de réponse de CCR2-K0-25 n'est pas due à une perte de fonctionnalité de CCR2 mais à un mauvais couplage entre le récepteur et le canal.

8.1.6.4 Discussion

CCR2-K0-25 n'est donc pour l'instant pas fonctionnel mais nous avons la preuve que cela n'est pas dû à une perte de fonction de CCR2 mais bien à une absence de couplage entre les deux composants de la fusion. Nous avons cependant rencontré une autre difficulté avec cet ICCR. En effet, il s'agit d'un des ICCR qui présente le plus faible courant basal, et ce, même en présence de TMD0 ce qui cause bien

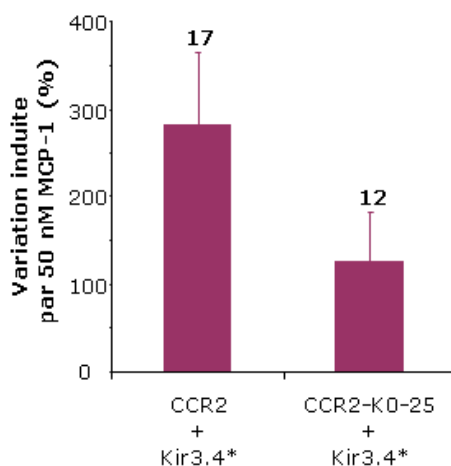


FIGURE 8.28 – Fonctionnalité de CCR2 seul ou en fusion avec Kir6.2. CCR2 et CCR2-K0-25 sont co-exprimés avec Kir3.4*, canal activé par les protéines G. Le pourcentage d'activation est mesuré suite à l'application de MCP-1 50 nM. Potentiel : -50 mV.

évidemment un obstacle à l'étude de la fonctionnalité du couple. Il faudrait dans un premier temps envisager de supprimer 22 et 33 résidus en C-ter dans le but d'obtenir les formes "M2-like" et "D2-like". Ensuite, des stratégies d'amélioration de l'expression pourraient être mises en œuvre, en rajoutant des séquences connues pour faciliter l'adressage membranaire de certains GPCR (cf. section 2.3.1), la délétion du N-ter étant à proscrire à cause de son importance dans l'interaction avec le ligand [201, 114].

8.2 M2-Kir6.2, outil d'exploration de l'arrangement du complexe

Pour l'instant, nous ne savons pas exactement comment sont arrangés dans l'espace les GPCR dans les différents ICCR établis. M2-K0-25 étant le premier couple à avoir été construit, et l'un des mieux caractérisés, nous l'avons mis à contribution pour tenter d'élucider l'arrangement du complexe formé par cet ICCR. Sachant que les GPCR peuvent s'associer pour former des dimères, nous supposons que cela pourrait être le cas dans les ICCR. Une autre possibilité envisageable est la répartition des GPCR de part et d'autre des sous-unités Kir6.2 (fig. 8.29). Dans l'optique d'éclaircir quelque peu cet arrangement et d'apporter ainsi des éléments supplémentaires pour la modélisation des ICCR, nous avons voulu voir si SUR, la sous-unité régulatrice du canal K_{ATP} était capable de s'insérer dans le complexe M2-K0-25. La présence de SUR se manifeste de deux manières : une modification de la sensibilité à l'ATP

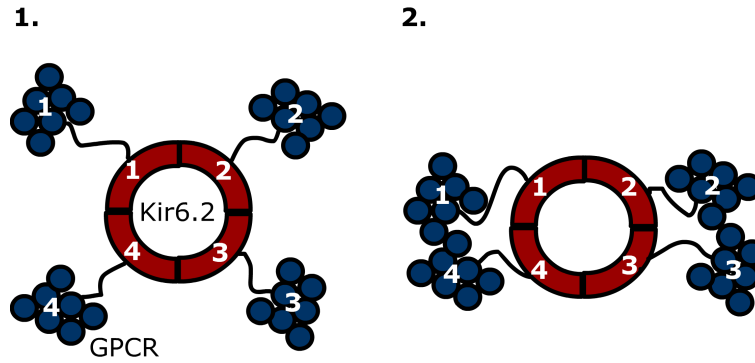


FIGURE 8.29 – Deux configurations envisageables des ICCR. (1) Les GPCR n'interagissent pas entre eux. (2) Les GPCR forment des dimères.

du canal et une sensibilité aux ouvreurs et inhibiteurs. Nous avons donc effectué des doses-réponse d'ATP sur M2-K0-25, M2-K0-30, M2-K0-0 et M2-K0-20 ceux-ci étant exprimés seuls, avec SUR1, SUR2A ou TMD0, avons testé deux ouvreurs (pinacidil et diazoxide) et un inhibiteur (glibenclamide) sur M2-K0-25 + SUR2A.

8.2.1 Sensibilité à l'ATP

La sensibilité à l'ATP témoigne de la présence et de la qualité du couplage entre SUR et Kir6.2. Nous avons co-injecté M2-K0-0, M2-K0-20, M2-K0-25 et M2-K0-30 avec SUR1, SUR2A et TMD0 afin de voir si SUR était capable de s'associer à ces différents ICCR. Sur ces bases, nous avons pu déterminer si SUR était présent (suivant la taille du "linker") et s'il pouvait réguler l'activité de Kir6.2 efficacement. Ce dernier point nous indique si SUR est correctement positionné par rapport à Kir6.2. Les expériences ont été réalisées en "patch-clamp" excisé "inside-out". Les ajustements ont été effectués avec le logiciel Origin suivant l'équation de Hill.

Les trois premiers ICCR (M2-K0-0, M2-K0-20, M2-K0-25) montrent une IC_{50} pour l'ATP comprise entre 120 et 150 μM . Ceci correspond à la sensibilité à l'ATP d'un Kir Δ [46, 314]. La dernière construction, M2-K0-30 présente une IC_{50} pour l'ATP de 278 μM , qui est plus proche de celle d'un Kir Δ + TMD0 que d'un Kir Δ seul. En supprimant trente résidus en N-ter de Kir6.2, nous avons sûrement dû modifier la sensibilité à l'ATP du canal.

M2-K0-0 co-exprimé avec SUR1 possède une IC_{50} de 56 μM qui s'apparente à celle d'un canal K_{ATP} . Il semblerait donc que, dans ce cas, l'association entre Kir6.2 et SUR1 ne soit pas entravée par la présence de M2. Néanmoins, nous ne pouvons pas en dire autant pour M2-K0-0 + SUR2A ($IC_{50}=134 \mu M$) dont la réponse à l'ATP ressemble à s'y méprendre à celle de M2-K0-0 exprimé seul. Ainsi, nous pouvons supposer que la liaison covalente de M2 en N-ter de Kir6.2 est un obstacle au couplage

avec SUR2A mais pas SUR1.

Dans le cas de M2-K0-20, l'IC₅₀ calculée en présence de SUR1 n'est pas significativement différente de celle obtenue avec M2-K0-20 (122 μ M et 150 μ respectivement). Ceci suggère que l'interaction entre SUR1 et Kir6.2 au sein de la construction est altérée. La co-expression de M2-K0-20 avec SUR2A a pour résultat une IC₅₀ de 80 μ M, valeur intermédiaire entre un canal K_{ATP} et un Kir6.2 Δ . Ce dernier résultat laisse à penser que les vingt résidus N-ter de Kir6.2 jouent un rôle, soit dans la disposition de M2 par rapport à Kir6.2 (empêchant SUR1 d'interagir avec le canal), soit dans le couplage avec SUR1.

M2-K0-25 co-exprimé avec SUR1 et SUR2A aboutit à l'obtention d'IC₅₀ intermédiaires (entre canal K_{ATP} et Kir6.2 Δ) (90 μ M et 96 μ M respectivement). Ces résultats sous-entendent que les sous-unités SUR s'associent à Kir6.2 délété de 25 résidus N-ter et fusionné à M2 mais modulent son "gating" de manière moins efficace que dans le cas du canal SUR + Kir6.2. Ils semblerait donc que SUR1 et SUR2A soient présents dans le complexe mais que la qualité du couplage soit modifiée du fait de la présence de M2 et/ou de la délétion N-ter Kir6.2.

La co-expression de SUR1 et SUR2A avec la construction M2-K0-30 donne lieu à des IC₅₀ de 319 et 249 μ M respectivement. Ces valeurs se trouvent être de l'ordre de grandeur de l'IC₅₀ de Kir6.2 Δ + TMD0. Nous remarquons que c'est également le cas de M2-K0-30 exprimé seul qui possède la plus élevée des IC₅₀ des ICCR (278 μ M). La délétion N-ter de trente résidus semble ici jouer un rôle primordial dans la sensibilité à l'ATP et rejoint les données présentées par Craig *et al.* sur le mutant Kir6.2 Δ 28-32 [58]. Seulement une mesure a pu être effectuée avec M2-K0-30 + TMD0 à cause du fort taux de mortalité des ovocytes injectés avec l'ARN correspondant.

De manière générale, la co-expression avec TMD0 donne lieu à une IC₅₀ qui coïncide avec celle de Kir6.2 Δ + TMD0 (M2-K0-0 + TMD0 : 225 μ M, M2-K0-20 + TMD0 : 568 μ M, M2-K0-25 + TMD0 : 348 μ M, M2-K0-30 + TMD0 : \emptyset). Ces IC₅₀, plus élevées que celles obtenues avec les ICCR exprimés seuls, témoignent de l'insertion de TMD0 dans le complexe puisque ce domaine de SUR1 est connu pour diminuer la sensibilité à l'ATP du canal [46].

En outre, il est à noter que la réponse à l'ADP est modifiée. En temps normal, le canal K_{ATP} est activé par l'ADP, en présence de Mg²⁺, à des concentrations pouvant aller de 10 à 500 μ M, suivant les sous-unités les composant. Au cours des doses-réponse d'ADP effectuées avec les couples M2-Kir6.2 + SUR, nous n'avons observé aucune activation (données non présentées). Ceci suggère que l'interaction entre SUR et Kir (couplé à M2) est altérée.

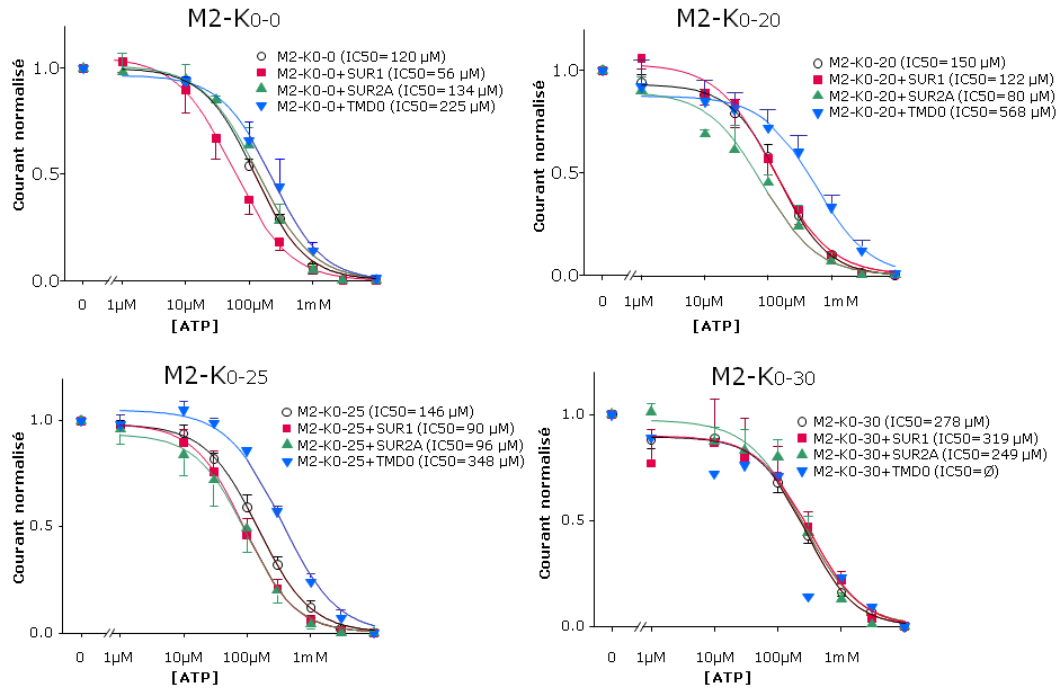


FIGURE 8.30 – Courbes doses-réponse d'ATP sur les couples M2-K0-0, M2-K0-20, M2-K0-25, M2-K0-30 exprimés seuls, avec SUR1, SUR2A ou TMD0. Dans le cas de M2-K0-30 + TMD0, le taux de mortalité élevé des ovocytes ne nous a pas permis de réaliser suffisamment d'enregistrements pour calculer l' EC_{50} . Potentiel : -50 mV.

Construction	Construction co-injectée	EC_{50}
M2-K0-0	\emptyset	120 μM
	SUR1	56 μM
	SUR2A	134 μM
	TMD0	225 μM
M2-K0-20	\emptyset	150 μM
	SUR1	122 μM
	SUR2A	80 μM
	TMD0	568 μM
M2-K0-25	\emptyset	146 μM
	SUR1	90 μM
	SUR2A	96 μM
	TMD0	348 μM
M2-K0-30	\emptyset	278 μM
	SUR1	319 μM
	SUR2A	249 μM
	TMD0	\emptyset

TABLE 8.1 – Récapitulatif des EC_{50} pour les constructions M2-Kir6.2.

FIGURE 8.31 – Effet de l'ouvreur pinacidil (10 μ M) sur M2-K0-25 + SUR2A en présence d'ATP 100 μ M. Potentiel : -50 mV.

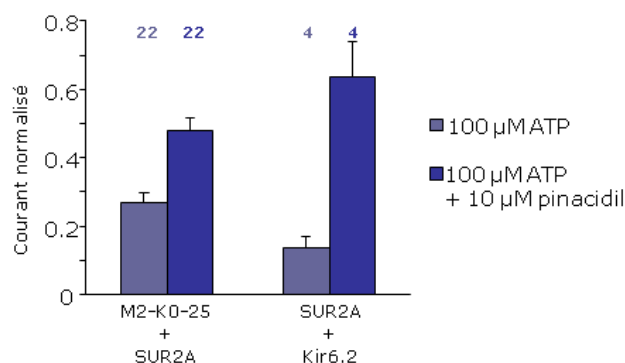
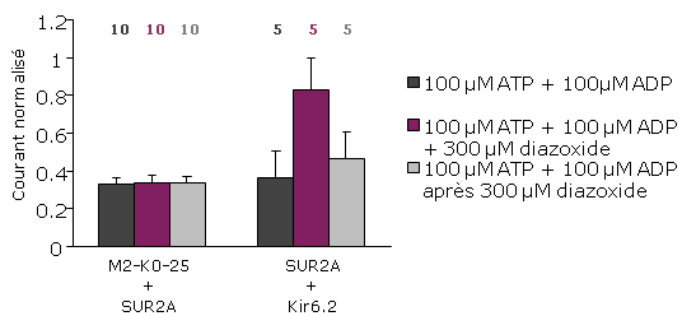


FIGURE 8.32 – Effet de l'ouvreur diazoxide (300 μ M) sur M2-K0-25 + SUR2A en présence de 100 μ M ATP et 100 μ M ADP. Potentiel : -50 mV.



8.2.2 M2-K0-25 peut-il former un complexe avec le récepteur aux sulfonylurées ?

Un moyen complémentaire donnant des indications sur l'association entre SUR et M2-Kir6.2 est l'utilisation d'ouvreurs et d'inhibiteurs qui se lient à SUR, qui, en réaction module l'activité de Kir6.2. M2-K0-25 co-exprimé avec SUR2A nous a servi à faire ces tests en "patch-clamp" excisé "inside-out". Tout d'abord, nous observons que le pinacidil (ouvreur) parvient à activer M2-K0-25 + SUR2A mais dans une moindre mesure que le canal Kir6.2 + SUR2A (fig. 8.31). Nous pouvons ainsi avancer que SUR est présent dans le complexe, qu'il peut modifier le "gating" du canal mais que l'efficacité de la communication entre SUR et Kir6.2 est altérée.

Par la suite, nous avons testé un autre ouvreur (diazoxide), en présence d'ATP et d'ADP 100 μ M, conditions requises pour assurer l'action de ce composé sur le canal K_{ATP} [69]. Les résultats montrent que le diazoxide n'a pas d'effet sur M2-K0-25 + SUR2A tandis que le contrôle SUR2A + Kir6.2 est activé par l'ajout de diazoxide (fig. 8.32). Ceci semble être une conséquence de la perte d'activation induite par l'ADP, l'action du diazoxide y étant étroitement liée.

Enfin, alors que l'application de glibenclamide (inhibiteur) à 300 nM, en présence d'ATP 10 μ M, provoque la fermeture du canal Kir6.2 + SUR2A, nous ne mesurons pas de blocage du canal composé par M2-Kir6.2 + SUR2A. Ces résultats nous indiquent que SUR2A est capable de s'associer à Kir6.2 fusionné à M2 mais que l'efficacité de couplage est partiellement altérée puisque le glibenclamide et le

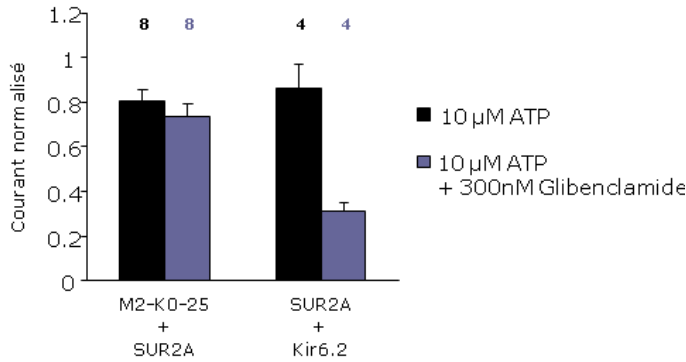


FIGURE 8.33 – Effet du glibenclamide à 300 nM sur M2-K0-25 + SUR2A en présence de 10 μ M ATP. Potentiel : -50 mV.

diazoxide ne présentent plus d'effet.

8.2.3 Discussion

Le but de ces expériences était de déterminer si le récepteur des sulfonylurées, SUR, protéine de 140–170 kDa, était capable de s'assembler au complexe tétramérique formé par les ICCR. Etant donné la taille de SUR, les résultats obtenus peuvent éventuellement nous donner des indications sur la "place" disponible entre le GPCR, M2 en l'occurrence, et Kir6.2 mais également sur la disposition des GPCR de part et d'autre du pore formé par les quatre Kir6.2.

8.2.3.1 Qu'apportent les courbes doses-réponse d'ATP ?

Les courbes doses-réponse d'ATP réalisées sur les différents couples M2-Kir6.2 seuls ou en présence de SUR1, SUR2A ou TMD0 sont de bons indicateurs de la qualité du couplage entre SUR et Kir6.2. En effet, l'ATP, pour Kir6.2 Δ présente une IC_{50} de 130–200 μ M environ, pour le canal K_{ATP} celle-ci est comprise entre 10 et 30 μ M et pour Kir6.2 Δ + TMD0 elle s'élève aux alentours de 300 μ M. Les résultats obtenus témoignent, dans certains cas, de la présence de la sous-unité SUR au sein du complexe M2-Kir6.2. En nous reposant sur les différences de sensibilité à l'ATP des couples M2-Kir6.2 exprimés seuls ou avec SUR1, SUR2A ou TMD0 nous avons pu déterminer si les SUR ou TMD0 avaient pu s'insérer dans le complexe formé par les M2-Kir6.2. Les données collectées montrent que, de manière générale, TMD0 peut interagir avec Kir6.2 au sein de la fusion, ce qui rejoint les résultats présentés dans les sections précédentes où TMD0 est utilisé comme une sorte d'adaptateur/chaperonne des ICCR (β_2 -Kir6.2, D3-Kir6.2, CB1-Kir6.2, ops-Kir6.2). De plus, la longueur du "linker" ne semble pas influencer cette interaction étant donné que la diminution de sensibilité à l'ATP se retrouve pour chaque construction testée (excepté M2-K0-30 pour cause de mortalité élevée des ovocytes). De cette manière, nous pouvons supposer que le N-ter de Kir6.2, du moins les 25 premiers résidus, n'interviennent pas dans l'interaction entre Kir6.2 et TMD0. En outre, le fait que le N-ter soit engagé

dans une liaison covalente avec le C-ter de M2 ne semble pas affecter l'effet induit par la présence de TMD0.

Les résultats obtenus en co-exprimant SUR1 ou SUR2A avec les différents couples M2-Kir6.2 nous donnent des informations relativement disparates. Nous n'avons pas de résultats tranchés nous permettant de confirmer de manière certaine la présence de SUR au sein des ICCR. Cependant, dans le cas de M2-K0-0 + SUR1 l'IC₅₀ de 56 μ M indique que SUR1 est bel et bien associé à Kir6.2 en fusion avec M2 (valeur proche de celle du K_{ATP}). De plus, M2-K0-25 co-exprimé avec SUR1 ou SUR2A nous donne des IC₅₀ intermédiaires (de l'ordre de 90 μ M) entre un Kir6.2 Δ et le canal K_{ATP}. Nous pouvons donc supposer que ce comportement pourrait résulter de l'association de moins de quatre sous-unités SUR. Un comportement semblable a déjà été observé avec la triple fusion SUR1~(Kir6.2)₂ où le C-ter de SUR1 est lié au N-ter du premier Kir6.2 [53]. Dans ce cas, le canal ne s'exprime que lorsqu'il est co-injecté avec SUR1 et présente une IC₅₀ pour l'ATP de 110 μ M qui est plus élevée que celle de SUR1 + Kir6.2. Si nous considérons que la diminution de sensibilité à l'ATP résulte de la fusion entre SUR1 et Kir6.2 qui entrave le couplage entre SUR1 et Kir6.2, cela signifie que seuls les SUR1 "libres", au nombre de deux, peuvent influencer la réponse à l'ATP du canal K_{ATP}. Cette situation peut être transposée à notre cas (fusion GPCR-Kir6.2) et supposerait que deux SUR peuvent s'insérer dans le complexe et modifier la sensibilité à l'ATP de Kir6.2. Cela n'est bien sûr qu'une hypothèse et elle nécessiterait des expériences complémentaires (*e.g.* co-expression de M2-Kir6.2 avec la fusion SUR-Kir6.2) pour être confirmée ou infirmée.

La sensibilité à l'ATP de M2-K0-30 est, dans tous les cas (exprimé seul, avec SUR1 ou SUR2A), déplacée par rapport aux autres couples M2-Kir6.2. En effet, les IC₅₀ se situent aux alentours de 250–300 μ M ce qui s'apparente à celle d'un Kir6.2 Δ + TMD0. Ce comportement semble découler de la délétion de trente résidus en N-ter de Kir6.2. En effet, l'existence d'un mutant de Kir6.2 possédant une sensibilité à l'ATP diminuée, Kir6.2 Δ 28–32, a été rapportée récemment [58]. Cette mutation, découverte chez un patient atteint de diabète néonatal permanent, semble augmenter la P_o du canal K_{ATP} en altérant le couplage entre Kir6.2 et SUR1. Ceci n'explique cependant pas pourquoi M2-K0-30 est également moins sensible à l'ATP puisque l'effet de la mutation Δ 28–32 se manifeste uniquement en présence de SUR1 [58]. Nous pouvons supposer que la combinaison de la fusion à M2 et de la délétion de trente résidus en N-ter a pour conséquence une diminution de la sensibilité à l'ATP, perturbant ainsi l'architecture du domaine de liaison de l'ATP de Kir6.2 qui est constitué par le N-ter d'une sous-unité Kir6.2 et le C-ter de la sous-unité voisine.

8.2.3.2 SUR est-il capable de s'associer avec M2-K0-25 ?

Une autre approche, permettant de détecter la présence de SUR au sein de complexe tétramérique formé par M2-Kir6.2, repose sur l'utilisation d'ouvriers et d'inhibiteurs. Ces composés interagissent avec SUR qui, en réponse, module le "gating" de Kir6.2. Nos expériences se sont concentrées sur le couple M2-K0-25 co-exprimé avec SUR2A. Les résultats obtenus ont montré que M2-K0-25 + SUR2A n'était plus sensible au diazoxide (en présence d'ATP 100 μ M et ADP 100 μ M), contrairement à SUR2A + Kir6.2. La réponse au diazoxide est étroitement liée à l'activation induite par l'ADP. Or, lors de doses-réponse d'ADP réalisées sur différents couples M2-Kir6.2 + SUR, nous avons constaté la perte de cette activation (données non présentées). De plus, l'application de glibenclamide 300 nM n'entraîne pas de fermeture des canaux alors qu'une inhibition est observée dans le cas de SUR2A + Kir6.2. M2-K0-25 + SUR2A ne présente donc ni sensibilité au diazoxide, ni au glibenclamide. Cependant, l'ajout de pinacidil à 10 μ M (en présence d'ATP 100 μ M) provoque une activation avoisinant les 20 % tandis que SUR2A + Kir6.2 est activé aux alentours de 60 %. Cela confirme la présence de SUR2A dans le complexe formé par M2-K0-25, la qualité du couplage entre SUR2A et Kir6.2 étant altérée. Ces données suggèrent aussi que, comme suspecté, le pinacidil et le diazoxide (en présence d'ADP) font appel à des interactions SUR/Kir distinctes.

Ces résultats nous laissent supposer que l'arrangement de M2 au sein du complexe ICCR permet l'insertion d'au moins un SUR. Une étape supplémentaire dans la détermination de la disposition des GPCR consiste à identifier leur degré d'oligomérisation. Pour ce faire, il nous serait possible de co-exprimer un ICCR avec un peptide correspondant à une région transmembranaire du GPCR impliquée dans l'oligomérisation. En effet, il a été montré, dans le cas du récepteur β_2 adrénergique que la présence du peptide TMVI empêchait sa dimérisation [112]. L'hélice TMVI ferait partie de l'interface entre deux monomères de récepteur β_2 adrénergique. Dans notre cas, une perte de fonction de l'ICCR induite par la présence d'un tel peptide signifierait que la formation de dimères est nécessaire au couplage entre GPCR et Kir6.2.

Conclusions et Perspectives

La première partie de ce travail de thèse s'est portée sur l'identification de molécules synthétiques pouvant agir sur le canal K_{ATP} . Dans un premier temps, nous avons testé deux insecticides, l'un (amitraz) étant connu pour provoquer, en cas d'intoxication, des perturbations de certaines fonctions physiologiques suggérant une implication du canal K_{ATP} et le second (diflubenzuron) agissant sur un homologue de SUR de mammifère, D_{SUR} découvert chez la drosophile. Ces expériences ne dévoilent aucun effet de ces molécules sur SUR1 + Kir6.2 ou SUR2A + Kir6.2. Ceci suggère donc que l'amitraz et le diflubenzuron ne modulent pas l'activité du canal K_{ATP} . Nous avons ensuite effectué le criblage d'une dizaine de composés sur SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2. Quatre molécules positives sont ressorties de cette série de tests. Nous avons mis en évidence deux ouvreurs de SUR1 + Kir6.2 et deux ouvreurs de SUR2A + Kir6.2. Ils constituent donc des médicaments potentiels qui seraient utiles pour le traitement de pathologies telles que l'hyperinsulinémie ou l'hypertension.

La seconde partie de ce travail de thèse a consisté en l'élaboration et la caractérisation de biocapteurs artificiels résultant de l'association d'un GPCR et d'un canal potassique rectifiant entrant Kir6.2. L'optimisation du couple β_2 -K0-25 a été une étape nécessaire à l'obtention d'un système fonctionnel. Ainsi, en modulant la taille du "linker" entre les deux constituants de cet ICCR, nous sommes parvenus à ouvrir le canal suite à la fixation d'un ligand (isoprotérénol) sur le récepteur. En outre, nous avons pu détecter la présence d'antagoniste (alprenolol). Nous avons également mis en évidence l'incidence d'une mutation du récepteur β_2 adrénergique (Glu122Trp) sur l'amplitude de la réponse induite par l'agoniste, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation des ICCR comme outil de caractérisation fonctionnelle des GPCR. L'obtention de la structure du récepteur β_2 adrénergique en 2007 par Cherezov *et al.* ouvre des perspectives en terme de modélisation moléculaire et pourrait apporter une lumière nouvelle sur le couplage entre le récepteur et Kir6.2. De plus, de tels outils pourraient servir à explorer le mécanisme de "gating" de Kir6.2 pouvant, par la suite être élargi au couplage entre SUR et Kir6.2 au sein du canal K_{ATP} . En plus du récepteur β_2 adrénergique, nous sommes parvenus à coupler Kir6.2 aux récepteurs CB1 et D3 de manière fonctionnelle. Le premier active le canal uniquement en présence de TMD0 et le second l'inhibe. Le comportement de D3-K0-25 est semblable à celui de D2-K0-25, les récepteurs D2 et D3 partageant environ 50 % d'identité. Cette similitude pourrait donc nous aider à comprendre la raison pour laquelle ces deux ICCR répondent par une diminution de courant tandis que les autres induisent une augmentation. Un autre ICCR, CCR2-K0-25 n'a pu être caractérisé en détail pour cause de défaut d'expression. Le contrôle de la fonctionnalité de CCR2 au sein de la fusion montre que le récepteur est toujours capable d'activer les protéines G hétérotrimériques, ce qui est un résultat plutôt encourageant. Néanmoins, un effort d'amélioration de l'expression est encore nécessaire pour pouvoir étudier le couplage

de cet ICCR. Nous pourrions également envisager d'effectuer des expériences complémentaires (chimiluminescence ou microscopie confocale), afin de déterminer si le faible courant basal mesuré est bien dû à un défaut d'adressage des ICCR. Cela est tout à fait réalisable étant donné la présence systématique d'une étiquette hémagglutinine dans ces constructions. Il est en effet possible qu'un niveau de courant basal bas puisse être le résultat de la présence de canaux fermés à la membrane. Dans ce cas, les ICCR s'adressent de manière correcte mais n'engendrent qu'un très faible courant.

De manière générale, il s'est avéré que TMD0, domaine transmembranaire N-ter de SUR, assurait une augmentation de l'expression des ICCR. Ce domaine interagit avec Kir6.2 et joue le rôle de chaperonne facilitant l'adressage à la membrane des ICCR. De surcroît, nous suspectons TMD0 de jouer un rôle dans la fonctionnalité du couplage, en modifiant le positionnement du GPCR par rapport à Kir6.2.

Dans la quête des ICCR basés sur l'opsine, nous devons trouver une alternative à l'activation de ce récepteur par la lumière, et ce, pour des raisons pratiques. Nous avons donc opté pour l'utilisation de rétinol tout-trans, produit de la photoisomérisation du rétinol 11-cis. Ainsi, nous avons pu montrer que le rétinol tout-trans était capable d'activer l'opsine en ovocyte de xénope, en utilisant Kir3.1*, canal potassique activé par les protéines G. Ceci nous apporte une information supplémentaire concernant la nature des protéines G couplées à l'opsine dans nos conditions. En effet, ce récepteur est couplé aux protéines $G\alpha_i$, alors que, dans les tissus natifs (rétine), il est couplé à la transducine. En outre, les données fournies par la courbe dose-réponse de rétinol tout-trans indiquent une forte coopérativité (coefficient de Hill=4). Ceci coïnciderait avec la présence d'oligomères d'opsine dans la membrane des ovocytes. Cependant, la cinétique d'activation relativement lente pourrait traduire un état d'oligomérisation inférieur à celui constaté dans les tissus natifs. Il serait judicieux de tenter d'observer ces structures par microscopie électronique même si cette technique n'est pas aisément applicable à l'ovocyte de xénope. Nous avons donc mis au point un dispositif de caractérisation de l'opsine par électrophysiologie en levant la contrainte imposée par la photoactivation. De cette manière, nous avons testé la fonctionnalité des ICCR opsine-Kir6.2 qui ne sont malheureusement pas fonctionnels. Il serait donc nécessaire d'optimiser le couplage. Une caractéristique de l'opsine est sa grande stabilité, ce qui a facilité son étude structurale. Nous pouvons donc supposer que les changements conformationnels induits par la fixation de rétinol tout-trans ne sont pas suffisants pour être détectés par Kir6.2. Par conséquent, une solution envisageable serait de rendre l'opsine moins stable, en réalisant la mutation inverse à celle opérée sur le récepteur β_2 adrénergique (Glu122Trp). Cela consisterait donc à construire un mutant opsine Trp126Glu espérant ainsi déverrouiller le récepteur et améliorer le couplage avec Kir6.2.

Enfin, nous avons mis à contribution les ICCR comprenant le récepteur muscarinique M2 afin d'explorer l'architecture de ces biocapteurs. Le but était de déterminer si l'arrangement des GPCR autour du pore formé par Kir6.2 permettait l'insertion de sous-unités SUR et de mettre en évidence l'effet de la taille du "linker" sur cette insertion. Les indicateurs de la présence de cette protéine sont la sensibilité à l'ATP et aux ouvreurs ou bloqueurs. Ainsi, nous avons constaté qu'au moins une sous-unité SUR pouvait interagir avec Kir6.2. SUR étant une protéine de grande taille (140 à 170 kDa), cela nous donne des indications quant à l'espace disponible au sein du complexe formé par l'ICCR. Néanmoins, il est à noter que le couplage entre Kir6.2, fusionné à M2, et SUR2A n'est pas optimal. La fusion et la délétion en N-ter de Kir6.2 pourraient avoir de telles conséquences. Des expériences complémentaires seraient bien sûr nécessaires pour déterminer si le récepteur muscarinique M2 s'associe en dimères ou reste à l'état de monomère dans le complexe M2-K0-25.

L'ensemble de ces travaux pourrait apporter un nouvel angle d'approche pour l'étude du "gating" de Kir6.2. De plus, les structures de GPCR connues et celles à venir sont susceptibles d'apporter des informations complémentaires dans le cadre de la modélisation moléculaire en vue de l'élucidation du mécanisme de couplage des ICCR. En outre, l'intégration de ces biocapteurs électriques artificiels dans des biopuces pourrait constituer des outils de criblage miniaturisés de composés. Ainsi, il serait possible de détecter la fixation d'un ligand sur un seul ICCR, et ce, en temps réel. Nous avons également montré au cours de ces travaux que les ICCR constituent un outil de caractérisation fonctionnelle des GPCR. Il reste bien évidemment de nombreux points d'ombre à élucider quant au mécanisme de couplage, mais le concept d'ICCR s'avère très prometteur.

Bibliographie

- [1] G.E. Abo-Elghar, P. Fujiyoshi, and F. Matsumura. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(8) :743–752, 2004.
- [2] E.A. Abu-Basha, S. Yibchok-Anun, D.L. Hopper, and W.H. Hsu. Effects of the pesticide amitraz and its metabolite BTS 27271 on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas : involvement of [alpha] 2D-Adrenergic receptors* 1. *Metabolism*, 48(11) :1461–1469, 1999.
- [3] L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, and M. Nakazaki. Of mice and men : KATP channels and insulin secretion. *Recent Progress in Hormone Research*, 56(1) :47–68, 2001.
- [4] L. Aguilar-Bryan, C.G. Nichols, S.W. Wechsler, J.P. Clement, et al. Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor : a regulator of insulin secretion. *Science*, 268(5209) :423–426, 1995.
- [5] M. Akao, H. Otani, M. Horie, M. Takano, A. Kuniyasu, H. Nakayama, I. Kouchi, S. Sasayama, and T. Murakami. Myocardial ischemia induces differential regulation of KATP channel gene expression in rat hearts. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 :3053–3059, 1997.
- [6] T. Akasaka, S. Klinedinst, K. Ocorr, E.L. Bustamante, S.K. Kim, and R. Bodmer. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32) :11999–12004, 2006.
- [7] AE Alekseev, ME Kennedy, B. Navarro, and A. Terzic. Burst kinetics of co-expressed Kir6.2/SUR1 clones : comparison of recombinant with native ATP-sensitive K⁺ channel behavior. *Journal of Membrane Biology*, 159(2) :161–168, 1997.
- [8] M.S. Ali, P.P. Sayeski, L.B. Dirksen, D.J. Hayzer, M.B. Marrero, and K.E. Bernstein. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37) :23382–23388, 1997.

- [9] S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922) :1718–1722, 2009.
- [10] H. Andersson, A.M. D’Antona, D.A. Kendall, G. Von Heijne, and C.N. Chin. Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1 : impact of a long N-terminal tail. *Molecular pharmacology*, 64(3) :570–577, 2003.
- [11] J.F. Antcliff, S. Haider, P. Proks, M.S.P. Sansom, and F.M. Ashcroft. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *The EMBO Journal*, 24(2) :229–239, 2005.
- [12] P. Aryal, H. Dvir, S. Choe, and P.A. Slesinger. A discrete alcohol pocket involved in GIRK channel activation. *Nature Neuroscience*, 12(8) :988–995, 2009.
- [13] FM Ashcroft. ATP-sensitive potassium channelopathies : focus on insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8) :2047–2058, 2005.
- [14] F.M. Ashcroft and F.M. Gribble. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends in Neurosciences*, 21(7) :288–294, 1998.
- [15] F.M. Ashcroft and F.M. Gribble. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion : their role in health and disease. *Diabetologia*, 42(8) :903–919, 1999.
- [16] R. Ashfield, F.M. Gribble, S.J. Ashcroft, and F.M. Ashcroft. Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K (ATP) channel. *Diabetes*, 48(6) :1341–1347, 1999.
- [17] T.K. Attwood and J.B.C. Findlay. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering Design and Selection*, 7(2) :195–203, 1994.
- [18] K.S. Atwal, G.J. Grover, N.J. Lodge, D.E. Normandin, S.C. Traeger, P.G. Sleph, R.B. Cohen, C.C. Bryson, and K.E.J. Dickinson. Binding of ATP-sensitive potassium channel (KATP) openers to cardiac membranes : Correlation of binding affinities with cardioprotective and smooth muscle relaxing potencies. *J. Med. Chem*, 41(3) :271–275, 1998.
- [19] A.P. Babenko and J. Bryan. SUR-dependent Modulation of KATP Channels by an N-terminal Kir6.2 Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46) :43997–44004, 2002.
- [20] A.P. Babenko and J. Bryan. Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43) :41577–41580, 2003.
- [21] A.P. Babenko, G. Gonzalez, and J. Bryan. The N-Terminus of Kir6.2 Limits Spontaneous Bursting and Modulates the ATP-Inhibition of KATP Channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(2) :231–238, 1999.

- [22] A.P. Babenko, G. Gonzalez, and J. Bryan. The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to KATP channel closure. *FEBS letters*, 459(3) :367–376, 1999.
- [23] A.P. Babenko, G. Gonzalez, and J. Bryan. Pharmacology of sulfonylurea receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2) :717–720, 2000.
- [24] A.P. Babenko, M. Polak, H. Cave, K. Busiah, P. Czernichow, R. Scharfmann, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, M. Vaxillaire, and P. Froguel. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 355(5) :456–466, 2006.
- [25] J.G. Baker. The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors. *British journal of pharmacology*, 144(3) :317–322, 2005.
- [26] V. Bancila, T. Cens, D. Monnier, F. Chanson, C. Faure, Y. Dunant, and A. Bloc. Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat KATP channel. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10) :8793–8799, 2005.
- [27] EA Barnard, R. Miledi, and K. Sumikawa. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 215(1199) :241–246, 1982.
- [28] T. Baukrowitz, U. Schulte, D. Oliver, S. Herlitze, T. Krauter, S.J. Tucker, J.P. Ruppersberg, and B. Fakler. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science*, 282(5391) :1141–1144, 1998.
- [29] T. Baukrowitz, S.J. Tucker, U. Schulte, K. Benndorf, J.P. Ruppersberg, and B. Fakler. Inward rectification in KATP channels : a pH switch in the pore. *The EMBO Journal*, 18(4) :847–853, 1999.
- [30] P. Béguin, K. Nagashima, M. Nishimura, T. Gono, and S. Seino. PKA-mediated phosphorylation of the human KATP channel : separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *The EMBO Journal*, 18(17) :4722–4732, 1999.
- [31] J.C. Bermak, M. Li, C. Bullock, and Q.Y. Zhou. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature cell biology*, 3(5) :492–498, 2001.
- [32] D. Bichet, F.A. Haass, and L.Y. Jan. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12) :957–967, 2003.
- [33] M. Bienengraeber, T.M. Olson, V.A. Selivanov, E.C. Kathmann, F. O’Connell, F. Gao, A.B. Karger, J.D. Ballew, D.M. Hodgson, L.V. Zingman, et al.

- ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nature genetics*, 36(4) :382–387, 2004.
- [34] A. Bloc, T. Cens, H. Cruz, and Y. Dunant. Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells : activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *The Journal of Physiology*, 529(3) :723–734, 2000.
- [35] J. Bockaert and J.P. Pin. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success. *The EMBO journal*, 18(7) :1723–1729, 1999.
- [36] A.D. Bonev and M.T. Nelson. Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *Journal of General Physiology*, 108(4) :315–323, 1996.
- [37] C. Bouzat, F. Gumilar, G. Spitzmaul, H.L. Wang, D. Rayes, S.B. Hansen, P. Taylor, and S.M. Sine. Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature*, 430(7002) :896–900, 2004.
- [38] O. Braha, L.Q. Gu, L. Zhou, X. Lu, S. Cheley, and H. Bayley. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nature biotechnology*, 18(9) :1005–1007, 2000.
- [39] O. Braha, B. Walker, S. Cheley, J.J. Kasianowicz, L. Song, J.E. Gouaux, and H. Bayley. Designed protein pores as components for biosensors. *Chemistry & biology*, 4(7) :497–505, 1997.
- [40] P.R. Brakeman, A.A. Lanahan, R. O’Brien, K. Roche, C.A. Barnes, R.L. Huganir, and P.F. Worley. Homer : a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386 :284–288, 1997.
- [41] R. Branstrom, I.B. Leibiger, B. Leibiger, B.E. Corkey, P.O. Berggren, and O. Larsson. Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47) :31395–31400, 1998.
- [42] J.R. Bunzow, H.H.M.V. Tol, D.K. Grandy, P. Albert, J. Salon, M.D. Christie, C.A. Machida, K.A. Neve, and O. Civelli. Cloning and expression of a rat D 2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336(6201) :783–787, 1988.
- [43] R.W. Butcher and E.W. Sutherland. Adenosine 3’, 5’-phosphate in biological materials. *J Biol Chem*, 237 :1244–1250, 1962.
- [44] MG Caron, Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kocielek, and RJ Lefkowitz. Affinity chromatography of the β -adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8) :2923–2927, 1979.
- [45] R.A. Cerione, D.R. Sibley, J. Codina, J.L. Benovic, J. Winslow, E.J. Neer, L. Birnbaumer, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz. Reconstitution of a hormone-

- sensitive adenylate cyclase system. The pure beta-adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. *Journal of Biological Chemistry*, 259(16) :9979–9982, 1984.
- [46] K.W. Chan, H. Zhang, and D.E. Logothetis. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *The EMBO Journal*, 22(15) :3833–3843, 2003.
 - [47] H.L. Chen, D. Gabrilovich, R. Tampé, K.R. Girgis, S. Nadaf, and D.P. Carbone. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature genetics*, 13(2) :210–213, 1996.
 - [48] J. Chen, G. Lu, J. Lin, A.L. Davidson, and F.A. Quioco. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Molecular cell*, 12(3) :651–661, 2003.
 - [49] Y. Chen and G. Struhl. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*, 87(3) :553–563, 1996.
 - [50] V. Cherezov, D.M. Rosenbaum, M.A. Hanson, S.G.F. Rasmussen, F.S. Thian, T.S. Kobilka, H.J. Choi, P. Kuhn, W.I. Weis, B.K. Kobilka, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein coupled receptor. *science*, 318(5854) :1258–1265, 2007.
 - [51] K. Choma, P. Bednarczyk, I. Koszela-Piotrowska, B. Kulawiak, A. Kudin, W.S. Kunz, K. Dołowy, and A. Szewczyk. Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 41(4) :323–334, 2009.
 - [52] W.A. Chutkow, J. Pu, M.T. Wheeler, T. Wada, J.C. Makielski, C.F. Burant, and E.M. McNally. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K ATP channels. *Journal of Clinical Investigation*, 110(2) :203–208, 2002.
 - [53] IV Clement, P. John, K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan, and J. Bryan. Association and stoichiometry of KATP channel subunits. *Neuron*, 18(5) :827–838, 1997.
 - [54] D.L. Cook and N. Hales. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311(5983) :271–273, 1984.
 - [55] T. Costa and A. Herz. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(19) :7321–7325, 1989.
 - [56] S. Cotecchia, S. Exum, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz. Regions of the α 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(8) :2896–2900, 1990.

- [57] M. Cotton and A. Claing. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular signalling*, 21(7) :1045–1053, 2009.
- [58] T.J. Craig, K. Shimomura, R.W. Holl, S.E. Flanagan, S. Ellard, and F.M. Ashcroft. An in-frame deletion in Kir6.2 (KCNJ11) causing neonatal diabetes reveals a site of interaction between Kir6.2 and SUR1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(7) :2551–2557, 2009.
- [59] A. Crane and L. Aguilar-Bryan. Assembly, maturation, and turnover of KATP channel subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10) :9080–9090, 2004.
- [60] A.P. Curnock, Y. Sotsios, K.L. Wright, and S.G. Ward. Optimal chemotactic responses of leukemic T cells to stromal cell-derived factor-1 requires the activation of both class IA and IB phosphoinositide 3-kinases. *The Journal of Immunology*, 170(8) :4021–4030, 2003.
- [61] Y. Daaka, L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz. Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655) :88–91, 1997.
- [62] M. Dabrowski, F.M. Ashcroft, R. Ashfield, P. Lebrun, B. Pirotte, J. Egebjerg, J. Bondo Hansen, and P. Wahl. The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1, 2, 4-benzothiadiazine 1, 1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes*, 51(6) :1896–106, 2002.
- [63] M. Dabrowski, A. Tarasov, and F.M. Ashcroft. Mapping the architecture of the ATP-binding site of the KATP channel subunit Kir6.2. *The Journal of Physiology*, 557(2) :347–354, 2004.
- [64] N. Dascal. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channel. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 22(4) :317–387, 1987.
- [65] A.L. Davidson and J. Chen. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 73(1) :241–268, 2004.
- [66] R.J.P. Dawson and K.P. Locher. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443(7108) :180–185, 2006.
- [67] A. De Lean, J.M. Stadel, and R.J. Lefkowitz. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 255(15) :7108–7117, 1980.
- [68] JR De Wille, H. Schmid-Antomarchi, M. Fosset, and M. Lazdunski. Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells : activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8) :2971–2975, 1989.
- [69] N. Dhahan, C. Moreau, A.L. Prost, H. Jacquet, A.E. Alekseev, A. Terzic, and M. Vivaudou. Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium

- channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(21) :12162–12167, 1999.
- [70] K.E. Dickinson, C.C. Bryson, R.B. Cohen, L. Rogers, D.W. Green, and K.S. Atwal. Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Molecular pharmacology*, 52(3) :473–481, 1997.
 - [71] R.A.F. Dixon, B.K. Kobilka, D.J. Strader, J.L. Benovic, H.G. Dohlman, T. Friele, M.A. Bolanowski, C.D. Bennett, E. Rands, R.E. Diehl, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 321 :75–78, 1986.
 - [72] C. Dong, C.M. Filipeanu, M.T. Duvernay, and G. Wu. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(4) :853–870, 2007.
 - [73] K. Dong, L.Q. Tang, G.G. MacGregor, Q. Leng, and S.C. Hebert. Novel nucleotide-binding sites in ATP-sensitive potassium channels formed at gating interfaces. *The EMBO Journal*, 24(7) :1318–1329, 2005.
 - [74] C.A. Doupnik, N. Davidson, and H.A. Lester. The inward rectifier potassium channel family. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(3) :268–277, 1995.
 - [75] D.A. Doyle, J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. The structure of the potassium channel : molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *science*, 280(5360) :69, 1998.
 - [76] J.P. Dupuis, J. Revilloud, C.J. Moreau, and M. Vivaudou. Three C-terminal residues from SUR contribute to the functional coupling between the KATP channel subunits SUR2A and Kir6.2. *J. Physiol*, 586 :3075–3085, 2008.
 - [77] M.T. Duvernay, C. Dong, X. Zhang, F. Zhou, C.D. Nichols, and G. Wu. Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors : function of the C-terminal F (X) 6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Molecular pharmacology*, 75(4) :751–761, 2009.
 - [78] D. Enkvetchakul and C.G. Nichols. Gating mechanism of KATP channels : function fits form. *Journal of General Physiology*, 122(5) :471–480, 2003.
 - [79] Z. Fan and J.C. Makielski. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9) :5388–5395, 1997.
 - [80] Z. Fan and J.C. Makielski. Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel : a molecular probe for the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *Journal of General Physiology*, 114(2) :251–269, 1999.
 - [81] K. Fang, L. Csanády, and K.W. Chan. The N-terminal transmembrane domain (TMD0) and a cytosolic linker (L0) of sulphonylurea receptor define the unique

- intrinsic gating of KATP channels. *The Journal of Physiology*, 576(2) :379–389, 2006.
- [82] S.S.G. Ferguson. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis : the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews*, 53(1) :1–24, 2001.
- [83] CS Fishburn, D. Belleli, C. David, S. Carmon, and S. Fuchs. A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8) :5872–5878, 1993.
- [84] D.B. Foster, J.J. Rucker, and E. Marbán. Is Kir6. 1 a subunit of mitoKATP ? *Biochemical and biophysical research communications*, 366(3) :649–656, 2008.
- [85] D. Fotiadis, Y. Liang, S. Filipek, D.A. Saperstein, A. Engel, and K. Palczewski. Atomic-force microscopy : rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 421(6919) :127–128, 2003.
- [86] R. Fredriksson, M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, and H.B. Schioth. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6) :1256–1272, 2003.
- [87] E. Frider. Endocannabinoids in the central nervous system-an overview* 1. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2-3) :221–233, 2002.
- [88] R.M. Gage, K.A. Kim, T.T. Cao, and M. von Zastrow. A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48) :44712–44720, 2001.
- [89] S.R. George, T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese, and B.F. O’Dowd. Oligomerization of μ - and δ -opioid receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34) :26128–26135, 2000.
- [90] J.P. Giblin, J.L. Leaney, and A. Tinker. The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32) :22652–22659, 1999.
- [91] I. Gomes, B.A. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy, and L.A. Devi. Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors : A Role in Opiate Synergy. *Journal of Neuroscience*, 20(22) :110, 2000.
- [92] O.B. Goodman, J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic. β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature*, 383(6599) :447–450, 1996.
- [93] SO Gopel, T. Kanno, S. Barg, and P. Rorsman. Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting δ -cells in intact mouse pancreatic islets. *The Journal of Physiology*, 528(3) :497–507, 2000.

- [94] SO Gopel, T. Kanno, S. Barg, XG Weng, J. Gromada, and P. Rorsman. Regulation of glucagon release in mouse α -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na⁺ channels. *The Journal of Physiology*, 528(3) :509–520, 2000.
- [95] M.M. Gottesman and S.V. Ambudkar. Overview : ABC transporters and human disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 33(6) :453–458, 2001.
- [96] F.M. Gribble, P. Proks, B.E. Corkey, and F.M. Ashcroft. Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41) :26383–26387, 1998.
- [97] F.M. Gribble, S.J. Tucker, and F.M. Ashcroft. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *The EMBO Journal*, 16(6) :1145–1152, 1997.
- [98] F.M. Gribble, S.J. Tucker, and F.M. Ashcroft. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes : a reinterpretation. *The Journal of Physiology*, 504(1) :35–45, 1997.
- [99] F.M. Gribble, S.J. Tucker, T. Haug, and F.M. Ashcroft. MgATP activates the β cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12) :7185–7190, 1998.
- [100] F.M. Gribble, S.J. Tucker, S. Seino, and F.M. Ashcroft. Tissue specificity of sulfonylureas : studies on cloned cardiac and beta-cell K (ATP) channels. *Diabetes*, 47(9) :1412–1418, 1998.
- [101] J.J. Grigg and E.G. Anderson. Glucose and sulfonylureas modify different phases of the membrane potential change during hypoxia in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 489(2) :302–310, 1989.
- [102] L.Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature*, 398(6729) :686–690, 1999.
- [103] I. Guillet-Deniau, A.F. Burnol, and J. Girard. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23) :14825–14829, 1997.
- [104] R.J. Gumina, D. Pucar, P. Bast, D.M. Hodgson, C.E. Kurtz, P.P. Dzeja, T. Miki, S. Seino, and A. Terzic. Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 284(6) :H2106–H2113, 2003.

- [105] C. Hague, Z. Chen, A.S. Pupo, N.A. Schulte, M.L. Toews, and K.P. Minneman. The N terminus of the human α 1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1) :388–397, 2004.
- [106] R.A. Hall, L.S. Ostedgaard, R.T. Premont, J.T. Blitzer, N. Rahman, M.J. Welsh, and R.J. Lefkowitz. A C-terminal motif found in the β 2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15) :8496–8501, 1998.
- [107] R.A. Hall, R.F. Spurney, R.T. Premont, N. Rahman, J.T. Blitzer, J.A. Pitcher, and R.J. Lefkowitz. G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34) :24328–24334, 1999.
- [108] OP Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and FJ Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2) :85–100, 1981.
- [109] M.A. Hanson, V. , M.T. Griffith, C.B. Roth, V.P. Jaakola, E.Y.T. Chien, J. Velasquez, P. Kuhn, and R.C. Stevens. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β 2-adrenergic receptor. *Structure*, 16(6) :897–905, 2008.
- [110] M.A. Hanson and R.C. Stevens. Discovery of new GPCR biology : one receptor structure at a time. *Structure*, 17(1) :8–14, 2009.
- [111] Y. Hayabuchi, N.W. Davies, and N.B. Standen. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C ϵ . *The Journal of Physiology*, 530(2) :193–205, 2001.
- [112] T.E. Hebert, S. Moffett, J.P. Morello, T.P. Loisel, D.G. Bichet, C. Barret, and M. Bouvier. A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27) :16384–16392, 1996.
- [113] D.A. Heck and D.B. Bylund. Differential down-regulation of α -2 adrenergic receptor subtypes. *Life Sciences*, 62(17-18) :1467–1472, 1998.
- [114] S. Hemmerich, C. Paavola, A. Bloom, S. Bhakta, R. Freedman, D. Grunberger, J. Krstenansky, S. Lee, D. McCarley, M. Mulkins, et al. Identification of Residues in the Monocyte Chemotactic Protein-1 That Contact the MCP-1 Receptor, CCR2. *Biochemistry*, 38(40) :13013–13025, 1999.

- [115] R. Henderson and P.N.T. Unwin. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257(5521) :28–32, 1975.
- [116] K. Heusser, H. Yuan, I. Neagoe, A.I. Tarasov, F.M. Ashcroft, and B. Schwapach. Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K⁺ channels. *Journal of cell science*, 119(20) :4353–4363, 2006.
- [117] H. Hibino, A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay, and Y. Kurachi. Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 90(1) :291–366, 2010.
- [118] C.F. Higgins and K.J. Linton. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*, 11(10) :918–926, 2004.
- [119] D.W. Hilgemann and R. Ball. Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science*, 273(5277) :956–959, 1996.
- [120] I.H.M. Ho and R.D. Murrell-Lagnado. Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13) :8639–8648, 1999.
- [121] D.M. Hodgson, L.V. Zingman, G.C. Kane, C. Perez-Terzic, M. Bienengraeber, C. Ozcan, R.J. Gumina, D. Pucar, F. OCoclain, D.L. Mann, et al. Cellular remodeling in heart failure disrupts KATP channel-dependent stress tolerance. *The EMBO Journal*, 22(8) :1732–1742, 2003.
- [122] K.P. Hofmann, P. Scheerer, P.W. Hildebrand, H.W. Choe, J.H. Park, M. Heck, and O.P. Ernst. A G protein-coupled receptor at work : the rhodopsin model. *Trends in biochemical sciences*, 34(11) :540–552, 2009.
- [123] K. Hollenstein, R.J.P. Dawson, and K.P. Locher. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology*, 17(4) :412–418, 2007.
- [124] Y. Horio, H. Hibino, A. Inanobe, M. Yamada, M. Ishii, Y. Tada, E. Satoh, Y. Hata, Y. Takai, and Y. Kurachi. Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20) :12885–12888, 1997.
- [125] E. Hosy, R. Derand, J. Revilloud, and M. Vivaudou. Remodelling of the SUR–Kir6.2 interface of the KATP channel upon ATP binding revealed by the conformational blocker rhodamine 123. *The Journal of Physiology*, 582(1) :27–39, 2007.
- [126] A.C. Howlett, C. Song, B.A. Berglund, G.H. Wilken, and J.J. Pigg. Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Molecular pharmacology*, 53(3) :504–510, 1998.

- [127] C.L. Huang, S. Feng, and D.W. Hilgemann. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391(6669) :803–806, 1998.
- [128] E.H. Hurowitz, J.M. Melnyk, Y.J. Chen, H. Kouros-Mehr, M.I. Simon, and H. Shizuya. Genomic Characterization of the Human Heterotrimeric G Protein α , β , and γ Subunit Genes. *DNA research*, 7(2) :111–120, 2000.
- [129] N. Inagaki, T. Gonoi, J.P. Clement IV, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino, and J. Bryan. Reconstitution of I (KATP) : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270(5239) :1166–1170, 1995.
- [130] N. Inagaki, T. Gonoi, J.P.C. Iv, C.Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, and S. Seino. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 16(5) :1011–1017, 1996.
- [131] N. Inagaki, T. Gonoi, and S. Seino. Subunit stoichiometry of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS letters*, 409(2) :232–236, 1997.
- [132] N. Inagaki, Y. Tsuura, N. Namba, K. Masuda, T. Gonoi, M. Horie, Y. Seino, M. Mizuta, and S. Seino. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *Journal of Biological Chemistry*, 270(11) :5691–5694, 1995.
- [133] A. Inanobe, H. Ito, M. Ito, Y. Hosoya, and Y. Kurachi. Immunological and physical characterization of the brain G protein-gated muscarinic potassium channel. *Biochemical and biophysical research communications*, 217(3) :1238–1244, 1995.
- [134] S. Isomoto, C. Kondo, M. Yamada, S. Matsumoto, O. Higashiguchi, Y. Horio, Y. Matsuzawa, and Y. Kurachi. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 271(40) :24321–24324, 1996.
- [135] V.P. Jaakola, M.T. Griffith, M.A. Hanson, V. Cherezov, E.Y.T. Chien, J.R. Lane, A.P. IJzerman, and R.C. Stevens. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science's STKE*, 322(5905) :1211–1217, 2008.
- [136] S. Jager, K. Palczewski, and K.P. Hofmann. Opsin/all-trans-Retinal Complex Activates Transducin by Different Mechanisms Than Photolyzed Rhodopsin. *Biochemistry*, 35(9) :2901–2908, 1996.
- [137] A. Jahangir and A. Terzic. KATP channel therapeutics at the bedside. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 39(1) :99–112, 2005.

- [138] M. Janbon, J. Chaptal, A. Vedel, and J. Schaap. Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiazol. *Montpellier Med*, 21 :21–22, 1942.
- [139] B. Jastrzebska, D. Fotiadis, G.F. Jang, R.E. Stenkamp, A. Engel, and K. Palczewski. Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17) :11917–11922, 2006.
- [140] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417(6888) :515–522, 2002.
- [141] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417(6888) :523–526, 2002.
- [142] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. X-ray structure of a voltage-dependent K channel. *Nature*, 423 :33–41, 2003.
- [143] P.M. Jones and A.M. George. The ABC transporter structure and mechanism : perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6) :682–699, 2004.
- [144] B.A. Jordan, N. Trapaidze, I. Gomes, R. Nivarthi, and L.A. Devi. Oligomerization of opioid receptors with β 2-adrenergic receptors : a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1) :343–348, 2001.
- [145] J.N. Joyce. Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2-3) :231–259, 2001.
- [146] J.N. Joyce and M.J. Millan. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug discovery today*, 10(13) :917–925, 2005.
- [147] Y. Kanaho, S.C. Tsai, R. Adamik, E.L. Hewlett, J. Moss, and M. Vaughan. Rhodopsin-enhanced GTPase activity of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12) :7378–7381, 1984.
- [148] A.B. Karger, S. Park, S. Reyes, M. Bienengraeber, R.B. Dyer, A. Terzic, and A.E. Alekseev. Role for SUR2A ED domain in allosteric coupling within the KATP channel complex. *Journal of General Physiology*, 131(3) :185–196, 2008.
- [149] A. Karlin. On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine . *Journal of Theoretical Biology*, 16(2) :306–320, 1967.
- [150] C. Karschin, C. Ecke, F.M. Ashcroft, and A. Karschin. Overlapping distribution of KATP channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS letters*, 401(1) :59–64, 1997.

- [151] V. Katritch, K.A. Reynolds, V. Cherezov, M.A. Hanson, C.B. Roth, M. Yeager, and R. Abagyan. Analysis of full and partial agonists binding to β 2-adrenergic receptor suggests a role of transmembrane helix V in agonist-specific conformational changes. *Journal of molecular recognition : JMR*, 22(4) :307–318, 2009.
- [152] T. Kenakin. Principles : receptor theory in pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, 25(4) :186–192, 2004.
- [153] P.S. Klein, T.J. Sun, C.L. Saxe 3rd, A.R. Kimmel, R.L. Johnson, and P.N. Devreotes. A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, 241(4872) :1467–1472, 1988.
- [154] T. Kleppisch and M.T. Nelson. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26) :12441–12445, 1995.
- [155] J. Klucken, C. Buchler, E. Ors3, W.E. Kaminski, M. Porsch-ozcurumez, G. Liebisch, M. Kapinsky, W. Diederich, W. Drobnik, M. Dean, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2) :817–822, 2000.
- [156] L.F. Kolakowski Jr. GCRDb : a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels*, 2(1) :1–7, 1994.
- [157] G. Koski, RA Streaty, and WA Klee. Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonists. An explanation for the dual requirement for Na+ and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(23) :14035–14040, 1982.
- [158] J.C. Koster, M.S. Remedi, C. Dao, and C.G. Nichols. ATP and Sulfonylurea Sensitivity of Mutant ATP-Sensitive K+ Channels in Neonatal Diabetes. *Diabetes*, 54(9) :2645–2654, 2005.
- [159] V. Krasnoperov, Y. Lu, L. Buryanovsky, T.A. Neubert, K. Ichchenko, and A.G. Petrenko. Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of α -latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48) :46518–46526, 2002.
- [160] T. Kubo, K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 323 :411–416, 1986.

- [161] A. Kuo, J.M. Gulbis, J.F. Antcliff, T. Rahman, E.D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F.M. Ashcroft, T. Ezaki, and D.A. Doyle. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science Signaling*, 300(5627) :1922–1926, 2003.
- [162] T.D. Lamb, E.N. Pugh, et al. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(3) :307–380, 2004.
- [163] D.G. Lambright, J. Sondek, A. Bohm, N.P. Skiba, H.E. Hamm, and P.B. Sigler. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, 379(6563) :311–320, 1996.
- [164] S.A. Laporte, R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron. The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30) :23120–23126, 2000.
- [165] K. Lee, AK Dixon, PJ Richardson, and RD Pinnock. Glucose-receptive neurons in the rat ventromedial hypothalamus express KATP channels composed of Kir6. 1 and SUR1 subunits. *The Journal of Physiology*, 515(2) :439–452, 1999.
- [166] S.P. Lee, C.H. So, A.J. Rashid, G. Varghese, R. Cheng, A.J. Lanca, B.F. O’Dowd, and S.R. George. Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *Science’s STKE*, 279(34) :35671, 2004.
- [167] P. Leff. The two-state model of receptor activation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(3) :89–97, 1995.
- [168] R.J. Lefkowitz. G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30) :18677–18680, 1998.
- [169] Y. Liang, D. Fotiadis, S. Filipek, D.A. Saperstein, K. Palczewski, and A. Engel. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24) :21655–21662, 2003.
- [170] P.E. Light, C. Bladen, R.J. Winkfein, M.P. Walsh, and R.J. French. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16) :9058–9063, 2000.
- [171] P.E. Light, A.S. Comtois, and J.M. Renaud. The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle : evidence for K⁺ ATP channel activation during fatigue. *The Journal of Physiology*, 475(3) :495–507, 1994.
- [172] D.H. Lin, H. Sterling, K.M. Lerea, G. Giebisch, and W.H. Wang. Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface ex-

- pression of ROMK1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46) :44278–44284, 2002.
- [173] Y.F. Lin, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *The EMBO Journal*, 19(5) :942–955, 2000.
 - [174] B. Liss, R. Bruns, and J. Roeper. Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *The EMBO Journal*, 18(4) :833–846, 1999.
 - [175] S.B. Long, X. Tao, E.B. Campbell, and R. MacKinnon. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, 450(7168) :376–382, 2007.
 - [176] A.N. Lopatin, E.N. Makhina, and C.G. Nichols. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372(6504) :366–369, 1994.
 - [177] C. Lopes, H. Zhang, T. Rohacs, T. Jin, J. Yang, and D.E. Logothetis. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron*, 34(6) :933–944, 2002.
 - [178] Z. Lu and R. MacKinnon. Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature*, 371(6494) :243–246, 1994.
 - [179] HJ Luhmann and U. Heinemann. Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *Journal of neurophysiology*, 67(4) :798–811, 1992.
 - [180] M.L. Lunn, R. Nassirpour, C. Arrabit, J. Tan, I. Mcleod, C.M. Arias, P.E. Sawchenko, J.R. Yates, and P.A. Slesinger. A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nature Neuroscience*, 10(10) :1249–1259, 2007.
 - [181] L.M. Luttrell, S.S.G. Ferguson, Y. Daaka, W.E. Miller, S. Maudsley, G.J. Della Rocca, F.T. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D.K. Luttrell, et al. β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283(5402) :655–661, 1999.
 - [182] R. MacKinnon. Potassium channels. *FEBS letters*, 555(1) :62–65, 2003.
 - [183] M. Margeta-Mitrovic, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. A trafficking checkpoint controls GABAB receptor heterodimerization. *Neuron*, 27(1) :97–106, 2000.
 - [184] M. Margeta-Mitrovic, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABAB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25) :14643–14648, 2001.

- [185] E. Markworth, C. Schwanstecher, and M. Schwanstecher. ATP4-mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes*, 49(9) :1413–1418, 2000.
- [186] M.B. Marrero, B. Schieffer, W.G. Paxton, L. Heerdt, B.C. Berk, P. Delafontaine, and K.E. Bernstein. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*, 375 :247–250, 1995.
- [187] C. Martin, C.F. Higgins, and R. Callaghan. The Vinblastine Binding Site Adopts High-and Low-Affinity Conformations during a Transport Cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 40(51) :15733–15742, 2001.
- [188] R. Masia, D. Enkvetchakul, and C.G. Nichols. Differential nucleotide regulation of KATP channels by SUR1 and SUR2A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(3) :491–501, 2005.
- [189] W. Matar, TM Nosek, D. Wong, and J.M. Renaud. Pinacidil suppresses contractility and preserves energy but glibenclamide has no effect during muscle fatigue. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 278(2) :C404–C416, 2000.
- [190] L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, and T.I. Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284) :561–564, 1990.
- [191] T. Matsuoka, K. Matsushita, Y. Katayama, A. Fujita, K. Inageda, M. Tanemoto, A. Inanobe, S. Yamashita, Y. Matsuzawa, and Y. Kurachi. C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Circulation research*, 87(10) :873–880, 2000.
- [192] P.H. McDonald, C.W. Chow, W.E. Miller, S.A. Laporte, M.E. Field, F.T. Lin, R.J. Davis, and R.J. Lefkowitz. Beta-arrestin 2 : a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science's STKE*, 290(5496) :1574–1577, 2000.
- [193] M.V. Mikhailov, J.D. Campbell, H. De Wet, K. Shimomura, B. Zadek, R.F. Collins, M.S.P. Sansom, R.C. Ford, and F.M. Ashcroft. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2–SUR1. *The EMBO Journal*, 24(23) :4166–4175, 2005.
- [194] M.V. Mikhailov, E.A. Mikhailova, and S.J.H. Ashcroft. Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell KATP channel. *FEBS letters*, 499(1-2) :154–160, 2001.
- [195] T. Miki, B. Liss, K. Minami, T. Shiuchi, A. Saraya, Y. Kashima, M. Horiuchi, F. Ashcroft, Y. Minokoshi, J. Roeper, et al. ATP-sensitive K⁺ channels in the

- hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *nature neuroscience*, 4(5) :507–512, 2001.
- [196] T. Miki, M. Suzuki, T. Shibasaki, H. Uemura, T. Sato, K. Yamaguchi, H. Koseki, T. Iwanaga, H. Nakaya, and S. Seino. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6. 1. *Nature medicine*, 8(5) :466–472, 2002.
 - [197] K. Minami, T. Miki, T. Kadowaki, and S. Seino. Roles of ATP-Sensitive K⁺ Channels as Metabolic Sensors. *Diabetes*, 53(suppl 3) :S176–S180, 2004.
 - [198] W. Mlynarski, A.I. Tarasov, A. Gach, C.A. Girard, I. Pietrzak, L. Zubcevic, J. Kusmieriek, T. Klupa, M.T. Malecki, and F.M. Ashcroft. Sulfonylurea improves CNS function in a case of intermediate DEND syndrome caused by a mutation in KCNJ11. *Nature Clinical Practice Neurology*, 3(11) :640–645, 2007.
 - [199] H. Mohler, D. Benke, and J.M. Fritschy. GABAB-receptor isoforms Molecular architecture and distribution. *Life Sciences*, 68(19-20) :2297–2300, 2001.
 - [200] J. Monod, J. Wyman, and JP Changeux. On the nature of allosteric transitions : a plausible model. *Journal of molecular biology*, 12 :88–118, 1965.
 - [201] F.S. Montecclaro and I.F. Charo. The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37) :23186–23190, 1997.
 - [202] J.H. Morais-Cabral, Y. Zhou, and R. MacKinnon. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, 414(6859) :37–42, 2001.
 - [203] C. Moreau, F. Gally, H. Jacquet-Bouix, and M. Vivaudou. The size of a single residue of the sulfonylurea receptor dictates the effectiveness of KATP channel openers. *Molecular pharmacology*, 67(4) :1026–1033, 2005.
 - [204] C. Moreau, H. Jacquet, A.L. Prost, N. Dhahan, and M. Vivaudou. The molecular basis of the specificity of action of KATP channel openers. *The EMBO Journal*, 19(24) :6644–6651, 2000.
 - [205] C. Moreau, A.L. Prost, R. Dérand, and M. Vivaudou. SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 38(6) :951–963, 2005.
 - [206] C.J. Moreau, J.P. Dupuis, J. Revilloud, K. Arumugam, and M. Vivaudou. Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing. *Nature Nanotechnology*, 3(10) :620–625, 2008.
 - [207] L. Movileanu, S. Howorka, O. Braha, and H. Bayley. Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore. *Nature biotechnology*, 18(10) :1091–1095, 2000.

- [208] E. Mukai, H. Ishida, M. Horie, A. Noma, Y. Seino, and M. Takano. The Anti-arrhythmic Agent Cibenzoline Inhibits KATP Channels by Binding to Kir6.2. *Biochemical and biophysical research communications*, 251(2) :477–481, 1998.
- [209] S. Mukhopadhyay, S.M. Cowsik, A.M. Lynn, W.J. Welsh, and A.C. Howlett. Regulation of Gi by the CB1 Cannabinoid Receptor C-Terminal Juxtamembrane Region : Structural Requirements Determined by Peptide Analysis. *Biochemistry*, 38(11) :3447–3455, 1999.
- [210] S. Mukhopadhyay and A.C. Howlett. Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. *Molecular pharmacology*, 67(6) :2016–2024, 2005.
- [211] A. Munoz, M. Nakazaki, J.C. Goodman, R. Barrios, C.G. Onetti, J. Bryan, and L. Aguilar-Bryan. Ischemic preconditioning in the hippocampus of a knockout mouse lacking SUR1-based KATP channels. *Stroke*, 34(1) :164–170, 2003.
- [212] N. Nakamura, Y. Suzuki, H. Sakuta, K. Ookata, K. Kawahara, and S. Hirose. Inwardly rectifying K⁺ channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells : implication for a functional coupling with Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochemical Journal*, 342(Pt 2) :329–336, 1999.
- [213] I. Nasonkin, A. Alikasifoglu, C. Ambrose, P. Cahill, M. Cheng, A. Sarniak, M. Egan, and P.M. Thomas. A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic Drosophila dorsal vessel and tracheal system. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41) :29420–29425, 1999.
- [214] E. Neher and B. Sakman. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature (Lond)*, 260 :779–802, 1976.
- [215] G. Nelson, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N.J.P. Ryba, and C.S. Zuker. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106(3) :381–390, 2001.
- [216] KE. Ng, S. Schwarzer, MR. Duchen, and A. Tinker. The intracellular localization and function of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit Kir6.1. *The Journal of Membrane Biology*, 234(2) :137–147, 2010.
- [217] C.G. Nichols and W.J. Lederer. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 261(6) :H1675–H1686, 1991.
- [218] C.G. Nichols and A.N. Lopatin. Inward rectifier potassium channels. *Annual Reviews of Physiology*, 59 :171–191, 1997.
- [219] CG Nichols, S.L. Shyng, A. Nestorowicz, B. Glaser, JP Clement Iv, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, MA Permutt, and J. Bryan. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*, 272(5269) :1785–1787, 1996.

- [220] J. Nie and D.L. Lewis. Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *Journal of Neuroscience*, 21(22) :8758–8764, 2001.
- [221] M. Nishida, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *The EMBO Journal*, 26(17) :4005–4015, 2007.
- [222] M. Nishida and R. MacKinnon. Structural Basis of Inward Rectification Cytoplasmic Pore of the G Protein-Gated Inward Rectifier GIRK1 at 1.8 Å Resolution. *Cell*, 111(7) :957–965, 2002.
- [223] R. Numano, S. Szobota, A.Y. Lau, P. Gorostiza, M. Volgraf, B. Roux, D. Trauner, and E.Y. Isacoff. Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16) :6814–6819, 2009.
- [224] G. O’Boyle, J.G. Brain, J.A. Kirby, and S. Ali. Chemokine-mediated inflammation : Identification of a possible regulatory role for CCR2. *Molecular immunology*, 44(8) :1944–1953, 2007.
- [225] Y. Okuyama, M. Yamada, C. Kondo, E. Satoh, S. Isomoto, T. Shindo, Y. Horio, M. Kitakaze, M. Hori, and Y. Kurachi. The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K⁺ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 435(5) :595–603, 1998.
- [226] O. Olsen, H. Liu, J.B. Wade, J. Merot, and P.A. Welling. Basolateral membrane expression of the Kir 2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 282(1) :C183–C195, 2002.
- [227] T.M. Olson, A.E. Alekseev, C. Moreau, X.K. Liu, L.V. Zingman, T. Miki, S. Seino, S.J. Asirvatham, A. Jahangir, and A. Terzic. KATP channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4(2) :110–116, 2007.
- [228] Y.A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, M.Y. Feigina, I.D. Artamonov, A.S. Zolotarev, M.B. Kostina, A.S. Bogachuk, A.I. Miroshnikov, V.I. Martinov, and A.B. Kudelin. The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. *Bioorg. Khim*, 8 :1011–1014, 1982.
- [229] J.P. Overington, B. Al-Lazikani, and A.L. Hopkins. How many drug targets are there? *Nature reviews Drug discovery*, 5(12) :993–996, 2006.
- [230] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I.L. Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, et al. Crystal structure of rhodopsin : AG protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480) :739–745, 2000.

- [231] J.H. Park, P. Scheerer, K.P. Hofmann, H.W. Choe, and O.P. Ernst. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, 454(7201) :183–187, 2008.
- [232] S.E. Pedersen and E.M. Ross. Functional activation of β -adrenergic receptors by thiols in the presence or absence of agonists. *Journal of Biological Chemistry*, 260(26) :14150–14157, 1985.
- [233] J. Petit-Jacques, J.L. Sui, and D.E. Logothetis. Synergistic Activation of G Protein-Gated Inwardly Rectifying Potassium Channels by the $\beta\gamma$ Subunits of G Proteins and Na^+ and Mg^{2+} Ions. *Journal of General Physiology*, 114(5) :673–684, 1999.
- [234] J.P. Pin, T. Galvez, and L. Pr  zeau. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 98(3) :325–354, 2003.
- [235] J.A. Pitcher, N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz. G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry*, 67(1) :653–692, 1998.
- [236] P. Proks and F.M. Ashcroft. Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21) :11716–11720, 1997.
- [237] P. Proks, C. Girard, H. B  vre, P.R. Nj  lstad, and F.M. Ashcroft. Functional effects of mutations at F35 in the NH2-terminus of Kir6.2 (KCNJ11), causing neonatal diabetes, and response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*, 55(6) :1731–1737, 2006.
- [238] P. Proks, K. Shimomura, T.J. Craig, C.A.J. Girard, and F.M. Ashcroft. Mechanism of action of a sulphonylurea receptor SUR1 mutation (F132L) that causes DEND syndrome. *Human molecular genetics*, 16(16) :2011–2019, 2007.
- [239] A.L. Prost, A. Bloc, N. Hussy, R. Derand, and M. Vivaudou. Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *The Journal of Physiology*, 559(1) :157–167, 2004.
- [240] A.S. Pupo, M.A. Uberti, and K.P. Minneman. N-terminal truncation of human α 1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European journal of pharmacology*, 462(1-3) :1–8, 2003.
- [241] J.M. Quayle, M.T. Nelson, and N.B. Standen. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological reviews*, 77(4) :1165–1232, 1997.
- [242] K.V. Quinn, J.P. Giblin, and A. Tinker. Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K^+ channel. *Circulation research*, 94(10) :1359–1366, 2004.

- [243] K.F. Raab-Graham and C.A. Vandenberg. Tetrameric subunit structure of the native brain inwardly rectifying potassium channel Kir 2.2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31) :19699–19707, 1998.
- [244] R.D. Rainbow, M. James, D. Hudman, M. Al Johi, H. Singh, P.J. Watson, I. Ashmole, N.W. Davies, D. Lodwick, and R.I. Norman. Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in KATP channels. *Biochemical Journal*, 379(Pt 1) :173–181, 2004.
- [245] R.D. Rainbow, D. Lodwick, D. Hudman, N.W. Davies, R.I. Norman, and N.B. Standen. SUR2A C-terminal fragments reduce KATP currents and ischaemic tolerance of rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, 557(3) :785–794, 2004.
- [246] B. Raisley, M. Zhang, D. Hereld, and J.A. Hadwiger. A cAMP receptor-like G protein-coupled receptor with roles in growth regulation and development. *Developmental biology*, 265(2) :433–445, 2004.
- [247] F. Reimann, F.M. Gribble, and F.M. Ashcroft. Differential response of KATP channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Molecular Pharmacology*, 58(6) :1318–1325, 2000.
- [248] F. Reimann, S.J. Tucker, P. Proks, and F.M. Ashcroft. Involvement of the N-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *The Journal of Physiology*, 518(2) :325–336, 1999.
- [249] Q. Ren, H. Kurose, R.J. Lefkowitz, and S. Cotecchia. Constitutively active mutants of the α 2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(22) :16483–16487, 1993.
- [250] B. Ribalet and G.T. Eddlestone. Characterization of the G protein coupling of a somatostatin receptor to the KATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *Journal of Physiology*, 485 :73–86, 1995.
- [251] B. Ribalet, S.A. John, and J.N. Weiss. Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. *Biophysical journal*, 84(1) :266–276, 2003.
- [252] M.S. Robinson and J.S. Bonifacino. Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4) :444–453, 2001.
- [253] J.M. Rodriguez-Frade, G. Del Real, A. Serrano, P. Hernanz-Falcon, S.F. Soriano, A.J. Vila-Coro, A.M. De Ana, P. Lucas, I. Prieto, C. Martinez-A, et al. Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. *The EMBO Journal*, 23(1) :66–76, 2004.
- [254] C.B. Roth, M.A. Hanson, and R.C. Stevens. Stabilization of the Human β 2-Adrenergic Receptor TM4–TM3–TM5 Helix Interface by Mutagenesis of Glu1223. 41, A Critical Residue in GPCR Structure. *Journal of Molecular Biology*, 376(5) :1305–1319, 2008.

- [255] G. Rousseau, F. Nantel, and M. Bouvier. Distinct receptor domains determine subtype-specific coupling and desensitization phenotypes for human beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Molecular pharmacology*, 49(4) :752–760, 1996.
- [256] K. Sachs, D. Maretzki, C.K. Meyer, and K.P. Hofmann. Diffusible ligand all-trans-retinal activates opsin via a palmitoylation-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9) :6189–6194, 2000.
- [257] H. Sakura, C. Ammala, P.A. Smith, F.M. , and F.M. Ashcroft. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS letters*, 377(3) :338–344, 1995.
- [258] P. Samama, S. Cotecchia, T. Costa, and R.J. Lefkowitz. A mutation-induced activated state of the β 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *Journal of Biological Chemistry*, 268(7) :4625–4636, 1993.
- [259] J.A. Sánchez, T. Gonoi, N. Inagaki, T. Katada, and S. Seino. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *The Journal of Physiology*, 507(2) :315–324, 1998.
- [260] Z.E. Sauna and S.V. Ambudkar. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6) :2515–2520, 2000.
- [261] L. Saveanu, S. Daniel, and P.M. van Endert. Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25) :22107–22113, 2001.
- [262] P. Scheerer, J.H. Park, P.W. Hildebrand, Y.J. Kim, N. Krauß, H.W. Choe, K.P. Hofmann, and O.P. Ernst. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455(7212) :497–502, 2008.
- [263] C. Schindler and J.E. Darnell Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands : the JAK-STAT pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1) :621–652, 1995.
- [264] H. Schmid-Antomarchi, J. de Weille, M. Fosset, and M. Lazdunski. The anti-diabetic sulfonylurea glibenclamide is a potent blocker of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin secreting cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 146(1) :21–25, 1987.
- [265] H. Schmid-Antomarchi, J. De Weille, M. Fosset, and M. Lazdunski. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 262(33) :15840–15844, 1987.

- [266] U.I. Scholl, M. Choi, T. Liu, V.T. Ramaekers, M.G. Hausler, J. Grimmer, S.W. Tobe, A. Farhi, C. Nelson-Williams, and R.P. Lifton. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14) :5842–5847, 2009.
- [267] T. Schoneberg, A. Schulz, H. Biebermann, T. Hermsdorf, H. Rompler, and K. Sangkuhl. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 104(3) :173–206, 2004.
- [268] R. Schulein, R. Hermosilla, A. Oksche, M. Dehe, B. Wiesner, G. Krause, and W. Rosenthal. A Dileucine Sequence and an Upstream Glutamate Residue in the Intracellular Carboxyl Terminus of the Vasopressin V2Receptor Are Essential for Cell Surface Transport in COS. M6 Cells. *Molecular pharmacology*, 54(3) :525–535, 1998.
- [269] M. Schwanstecher, C. Sieverding, H. Dorschner, I. Gross, L. Aguilar-Bryan, C. Schwanstecher, and J. Bryan. Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *The EMBO Journal*, 17(19) :5529–5535, 1998.
- [270] B. Schwappach, N. Zerangue, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. Molecular Basis for KATP Assembly Transmembrane Interactions Mediate Association of a K⁺ Channel with an ABC Transporter. *Neuron*, 26(1) :155–167, 2000.
- [271] T.W. Schwartz, T.M. Frimurer, B. Holst, M.M. Rosenkilde, and C.E. Elling. Molecular mechanism of 7TM receptor activation. A global toggle switch model. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46 :481–519, 2006.
- [272] R. Seifert and K. Wenzel-Seifert. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors : cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology*, 366(5) :381–416, 2002.
- [273] S. Seino. ATP-sensitive potassium channels : a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annual review of physiology*, 61(1) :337–362, 1999.
- [274] H. Selye. Stress without distress. *School Guidance Worker*, 32(5) :5–13, 1977.
- [275] Y. Shi, Z. Wu, N. Cui, W. Shi, Y. Yang, X. Zhang, A. Rojas, B.T. Ha, and C. Jiang. PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by β -adrenergic receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(3) :R1205–R1214, 2007.
- [276] T.M. Shih, R.D. Smith, L. Toro, and A.L. Goldin. High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods in enzymology*, 293 :529–556, 1998.

- [277] T. Shindo, Y. Horio, and Y. Kurachi. Sulphonylurea receptor 2B and Kir6. 1 form sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *The Journal of physiology*, 499 :715–720, 1997.
- [278] E. Shumilina, N. Klocker, G. Korniychuk, M. Rapedius, F. Lang, and T. Baukowitz. Cytoplasmic accumulation of long-chain coenzyme A esters activates KATP and inhibits Kir2.1 channels. *The Journal of Physiology*, 575(2) :433–442, 2006.
- [279] S.L. Shyng, C.A. Cukras, J. Harwood, and C.G. Nichols. Structural determinants of PIP₂ regulation of inward rectifier KATP channels. *Journal of General Physiology*, 116(5) :599–608, 2000.
- [280] S.L. Shyng, T. Ferrigni, and C.G. Nichols. Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP : distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *Journal of General Physiology*, 110(6) :643–654, 1997.
- [281] S.L. Shyng and C.G. Nichols. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *Journal of General Physiology*, 110(6) :655–664, 1997.
- [282] S.L. Shyng and C.G. Nichols. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science*, 282(5391) :1138–1141, 1998.
- [283] E. Sigel, R. Baur, G. Trube, H. Mohler, and P. Malherbe. The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron*, 5(5) :703–711, 1990.
- [284] J.E. Smotrys and M.E. Linder. Palmitoylation of Intracellular Signaling Proteins : Regulation and Function. *Annual review of biochemistry*, 73(1) :559–587, 2004.
- [285] P. Sokoloff, B. Giros, M.P. Martres, M.L. Bouthenet, and J.C. Schwartz. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature*, 6289(347) :146–151, 1990.
- [286] J. Sondek, A. Bohm, D.G. Lambright, H.E. Hamm, and P.B. Sigler. Crystal structure of a G α protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature*, 379(6563) :311–319, 1996.
- [287] AE Spruce, NB Standen, and PR Stanfield. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*, 316(6030) :736–738, 1985.
- [288] P.R. Stanfield, N.W. Davies, P.A. Shelton, M.J. Sutcliffe, I.A. Khan, W.J. Brammar, and E.C. Conley. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg²⁺ of the inward rectifier, IRK1. *The Journal of Physiology*, 478(Pt 1) :1–6, 1994.

- [289] N.C. Sturgess, D.L. Cook, M.L. Ashford, et al. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *The Lancet*, 326(8453) :474–475, 1985.
- [290] J.L. Sui, J. Petit-Jacques, and D.E. Logothetis. Activation of the atrial KACH channel by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins or intracellular Na^+ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3) :1307–1312, 1998.
- [291] S. Summerhill, T. Stroud, R. Nagendra, C. Perros-Huguet, and M. Trevethick. A cell-based assay to assess the persistence of action of agonists acting at recombinant human $[\beta]$ 2 adrenoceptors. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 58(3) :189–197, 2008.
- [292] Y. Sun, Z. Cheng, L. Ma, and G. Pei. β -Arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51) :49212–49219, 2002.
- [293] E.W. Sutherland. Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, 177(47) :401–408, 1972.
- [294] E.W. Sutherland and G.A. Robison. A. The role of cyclic-3', 5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacological Reviews*, 18(1) :145–161, 1966.
- [295] M. Suzuki, K. Fujikura, N. Inagaki, S. Seino, and K. Takata. Localization of the ATP-sensitive K^+ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes*, 46(9) :1440–1444, 1997.
- [296] M. Suzuki, K. Kotake, K. Fujikura, N. Inagaki, T. Suzuki, T. Gono, S. Seino, and K. Takata. Kir6. 1 : a possible subunit of ATP-sensitive K^+ channels in mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 241(3) :693–697, 1997.
- [297] M. Suzuki, R.A. Li, T. Miki, H. Uemura, N. Sakamoto, Y. Ohmoto-Sekine, M. Tamagawa, T. Ogura, S. Seino, E. Marban, et al. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circulation research*, 88(6) :570–577, 2001.
- [298] S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D.L. Fortin, K.D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H.L. Aaron, et al. Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron*, 54(4) :535–545, 2007.
- [299] G.J. Taborsky, B. Ahren, and P.J. Havel. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia : implications for impaired α -cell responses in type 1 diabetes. *Diabetes*, 47(7) :995–1005, 1998.

- [300] S. Takida and P.B. Wedegaertner. Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of $G\beta\gamma$. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19) :17284–17290, 2003.
- [301] P. Tammaro, C. Girard, J. Molnes, P.R. Njølstad, and F.M. Ashcroft. Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes provide new insights into Kir6.2–SUR1 interactions. *The EMBO Journal*, 24(13) :2318–2330, 2005.
- [302] P. Tammaro, P. Proks, and F.M. Ashcroft. Functional effects of naturally occurring KCNJ11 mutations causing neonatal diabetes on cloned cardiac KATP channels. *The Journal of Physiology*, 571(1) :3–14, 2006.
- [303] W. Tan, D. Martin, and J.S. Gutkind. The $G\alpha 13$ -Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51) :39542–39549, 2006.
- [304] X. Tao, J.L. Avalos, J. Chen, and R. MacKinnon. Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inward-Rectifier K^+ Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution. *Science*, 326(5960) :1668–1674, 2009.
- [305] E.W. Taylor and A. Agarwal. Sequence homology between bacteriorhodopsin and G-protein coupled receptors : exon shuffling or evolution by duplication ? *FEBS letters*, 325(3) :161–166, 1993.
- [306] A. Terakita, T. Yamashita, N. Nimbari, D. Kojima, and Y. Shichida. Functional interaction between bovine rhodopsin and G protein transducin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1) :40–46, 2002.
- [307] A. Terzic, R.T. Tung, A. Inanobe, T. Katada, and Y. Kurachi. G proteins activate ATP-sensitive K^+ channels by antagonizing ATP-dependent gating. *Neuron*, 12(4) :885–893, 1994.
- [308] A. Tohgo, K.L. Pierce, E.W. Choy, R.J. Lefkowitz, and L.M. Luttrell. β -Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11) :9429–9436, 2002.
- [309] S. Trapp, S.J. Tucker, and F.M. Ashcroft. Activation and inhibition of K-ATP currents by guanine nucleotides is mediated by different channel subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16) :8872–8877, 1997.
- [310] G. Trube, P. Rorsman, and T. Ohno-Shosaku. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 407(5) :493–499, 1986.
- [311] P. Tsao, T. Cao, and M. von Zastrow. Role of endocytosis in mediating down-regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(2) :91–96, 2001.

- [312] J.C. Tu, B. Xiao, J.P. Yuan, A.A. Lanahan, K. Leoffert, M. Li, D.J. Linden, and P.F. Worley. Homer binds a novel proline-rich motif and links group I metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *NEURON-CAMBRIDGE MA-*, 21 :717–726, 1998.
- [313] S.J. Tucker, F.M. Gribble, P. Proks, S. Trapp, T.J. Ryder, T. Haug, F. Reimann, and F.M. Ashcroft. Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *The EMBO Journal*, 17(12) :3290–3296, 1998.
- [314] S.J. Tucker, F.M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp, and F.M. Ashcroft. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*, 387 :179–183, 1997.
- [315] J.K. Tyzack, X. Wang, G.J. Belsham, and C.G. Proud. ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44) :34131–34139, 2000.
- [316] K. Ueda, N. Inagaki, and S. Seino. MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37) :22983–22986, 1997.
- [317] W.H. Vila-Carriles, G. Zhao, and J. Bryan. Defining a binding pocket for sulfonylureas in ATP-sensitive potassium channels. *The FASEB Journal*, 21(1) :18–25, 2007.
- [318] C.R. Vinson, S. Conover, and P.N. Adler. A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature*, 338(6212) :263–264, 1989.
- [319] M. Vivaudou, K.W. Chan, J.L. Sui, L.Y. Jan, E. Reuveny, and D.E. Logothetis. Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of the KACH channel, using functional homomeric mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50) :31553–31560, 1997.
- [320] M.P. Viveros, F.R. de Fonseca, F.J. Bermudez-Silva, and J.M. McPartland. Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, 8(3) :220–230, 2008.
- [321] Y. Wada, T. Yamashita, K. Imai, R. Miura, K. Takao, M. Nishi, H. Takeshima, T. Asano, R. Morishita, K. Nishizawa, et al. A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. *The EMBO Journal*, 19(18) :4915–4925, 2000.
- [322] C.A. Wagner, B. Friedrich, I. Setiawan, F. Lang, and S. Broer. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously

- expressed membrane proteins. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 10(1-2) :1–12, 2000.
- [323] M.A. Wall, D.E. Coleman, E. Lee, J.A. Iniguez-Lluhi, B.A. Posner, A.G. Gilman, and S.R. Sprang. The structure of the G protein heterotrimer $G_i \alpha 1 \beta 1 \gamma 2$. *Cell*, 83(6) :1047–1058, 1995.
- [324] A. Ward, C.L. Reyes, J. Yu, C.B. Roth, and G. Chang. Flexibility in the ABC transporter MsbA : Alternating access with a twist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48) :19005–19010, 2007.
- [325] T. Warne, M.J. Serrano-Vega, J.G. Baker, R. Moukhametzianov, P.C. Edwards, R. Henderson, A.G.W. Leslie, C.G. Tate, and G.F.X. Schertler. Structure of beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 454 :486–491, 2008.
- [326] J.M. Weiss, P.H. Morgan, M.W. Lutz, and T.P. Kenakin. The cubic ternary complex receptor-occupancy model I. Model description. *Journal of Theoretical Biology*, 178(2) :151–167, 1996.
- [327] G.C. Wellman, J.M. Quayle, and N.B. Standen. ATP-sensitive K^+ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 507(1) :117–129, 1998.
- [328] J.H. White, A. Wise, M.J. Main, A. Green, N.J. Fraser, G.H. Disney, A.A. Barnes, P. Emson, S.M. Foord, F.H. Marshall, et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA \sim B receptor. *Nature*, 396(6712) :679–682, 1998.
- [329] J.H. White, A. Wise, and F.H. Marshall. Heterodimerization of γ -aminobutyric acid B receptor subunits as revealed by the yeast two-hybrid system. *Methods*, 27(4) :301–310, 2002.
- [330] J. Wu, N. Cui, H. Piao, Y. Wang, H. Xu, J. Mao, and C. Jiang. Allosteric modulation of the mouse Kir6.2 channel by intracellular H^+ and ATP. *The Journal of Physiology*, 543(2) :495–504, 2002.
- [331] C. Wyart, F. Del Bene, E. Warp, E.K. Scott, D. Trauner, H. Baier, and E.Y. Isacoff. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, 461(7262) :407–410, 2009.
- [332] R.P. Xiao, S. Pepe, H.A. Spurgeon, M.C. Capogrossi, and E.G. Lakatta. Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 272(2) :797–805, 1997.

- [333] H. Xu, N. Cui, Z. Yang, J. Wu, L.R. Giwa, L. Abdulkadir, P. Sharma, and C. Jiang. Direct activation of cloned KATP channels by intracellular acidosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16) :12898–12902, 2001.
- [334] H. Xu, J. Wu, N. Cui, L. Abdulkadir, R. Wang, J. Mao, L.R. Giwa, S. Chanchavalap, and C. Jiang. Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned KATP channel. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42) :38690–38696, 2001.
- [335] K. Yamada, J.J. Ji, H. Yuan, T. Miki, S. Sato, N. Horimoto, T. Shimizu, S. Seino, and N. Inagaki. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science*, 292(5521) :1543–1546, 2001.
- [336] M. Yamada, A. Inanobe, and Y. Kurachi. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacological reviews*, 50(4) :723–760, 1998.
- [337] M. Yamada and Y. Kurachi. The nucleotide-binding domains of sulfonylurea receptor 2A and 2B play different functional roles in nicorandil-induced activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Molecular pharmacology*, 65(5) :1198–1207, 2004.
- [338] F. Yan, C.W. Lin, E. Weisiger, E.A. Cartier, G. Taschenberger, and S.L. Shyng. Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12) :11096–11105, 2004.
- [339] X. Yao, C. Parnot, X. Deupi, V.R.P. Ratnala, G. Swaminath, D. Farrens, and B. Kobilka. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the β 2-adrenoceptor. *Nature Chemical Biology*, 2(8) :417–422, 2006.
- [340] H. Yuan, K. Michelsen, and B. Schwappach. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Current biology*, 13(8) :638–646, 2003.
- [341] N. Zerangue, B. Schwappach, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane KATP channels. *Neuron*, 22(3) :537–548, 1999.
- [342] G.Q. Zhao, Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N.J.P. Ryba, and C.S. Zuker. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3) :255–266, 2003.
- [343] Z. Zhao, C.C. Lee, A. Baldini, and C.T. Caskey. A human homologue of the *Drosophila* polarity gene *frizzled* has been identified and mapped to 17q21. 1. *Genomics*, 27(2) :370–373, 1995.
- [344] Y. Zhou and R. MacKinnon. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter : charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *Journal of molecular biology*, 333(5) :965–975, 2003.

- [345] Y. Zhou, J.H. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. MacKinnon. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ ; channel–Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414(6859) :43–48, 2001.
- [346] L.V. Zingman, A.E. Alekseev, M. Bienengraeber, D. Hodgson, A.B. Karger, P.P. Dzeja, and A. Terzic. Signaling in Channel/Enzyme Multimers : : ATPase Transitions in SUR Module Gate ATP-Sensitive K^+ Conductance. *Neuron*, 31(2) :233–245, 2001.
- [347] B.J. Zunkler, S. Lenzen, K. Manner, U. Panten, and G. Trube. Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K^+ currents in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology*, 337(2) :225–230, 1988.

Titre

Conception et caractérisation de biocapteurs basés sur l'assemblage de récepteurs et canaux ioniques

Résumé

Les canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}) résultent de l'association unique d'une protéine ABC (le récepteur des sulfonylurées, SUR) et d'un canal potassique rectifiant entrant (Kir6.x). Suite à la liaison de divers effecteurs (nucléotides, molécules pharmacologiques), SUR module l'activité de Kir6.x. Dans l'organisme, les canaux K_{ATP} lient le niveau énergétique de la cellule au potentiel membranaire. De ce fait, leur implication dans diverses fonctions physiologiques telles que la sécrétion pancréatique d'insuline ou le contrôle du tonus vasculaire en fait des cibles thérapeutiques. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration, nous avons testé des composés (dérivés benzothiazine) sur le canal K_{ATP} . Quatre d'entre eux se sont avérés être des ouvreurs des canaux K_{ATP} . Nous avons également exploré l'effet de deux insecticides, l'amitraz et le diflubenzuron sur le canal K_{ATP} .

En outre, dans une optique de généralisation du concept d'Ion Channel-Coupled Receptor (ICCR) mis au point par l'équipe, nous avons élaboré des biocapteurs reposant sur l'assemblage de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et Kir6.2. Cette association, inspirée par le canal K_{ATP} , est réalisée de telle manière que la fixation d'un ligand sur le GPCR entraîne la modulation de l'activité de Kir6.2. L'ingénierie moléculaire nous a permis de fusionner Kir6.2 aux récepteurs β_2 adrénergique, dopaminergique D3, cannabinoïde 1 (CB1), des CC-chimiokines 2 et à l'opsine. La méthode de double-microélectrodes nous a permis d'identifier trois ICCR fonctionnels basés sur les récepteurs β_2 , D3 et CB1. Ces biocapteurs présentent des applications dans le cadre du criblage haut débit, la caractérisation fonctionnelle des GPCR ou la compréhension de la régulation de l'activité de Kir6.2.

Title

Design and characterization of biosensors based on the covalent assembly of receptors and ion channels

Abstract

ATP sensitive potassium channels (K_{ATP}) comprise two proteins : The sulfonylurea receptor (SUR, an ABC protein) and an inward rectifier potassium channel (Kir6.2). Upon binding of different types of effectors (nucleotides, pharmacological compounds), SUR, the regulatory subunit, modulates the gating of Kir6.2. The K_{ATP} channel links the metabolic state of the cell to its electrical excitability. Thereby, it acts as a metabolic sensor and is involved in physiological functions such as insulin secretion, cardioprotection, vascular tone control. . . Thus, the K_{ATP} channel constitutes a therapeutic target. In this work, we studied the effects of benzothiazine derivatives on SUR1 + Kir6.2 and SUR2A + Kir6.2. We also investigated the effects of two pesticides, amitraz and diflubenzuron, on the K_{ATP} channel.

To extend the concept of Ion Channel-Coupled Receptor (ICCR) initiated in the laboratory, we designed new constructs by engineering fusion between Kir6.2 and five GPCRs : the β_2 adrenergic, cannabinoid 1 (CB1), dopaminergic D3, CC-chemokine (CCR2) receptors and opsin. The receptor C-ter and Kir6.2 N-ter extremities were pared to promote efficient coupling and joined covalently. The fusions were heterologously expressed in *Xenopus* oocytes and characterized by the two-electrode voltage clamp technique. Three ICCR (β_2 -based, CB1-based and D3-based) out of five were shown to be functional. Thus, the ICCR concept is readily applicable to class A GPCRs. Besides their obvious interest in drug screening, the new ICCRs should be valuable tools to investigate the intermolecular events involved in the modulation of Kir6.2 gating and the nature of the GPCR conformational changes evoked by their ligands.

Discipline

Biologie structurale et nanobiologie

Mots Clés

GPCR, canal K_{ATP} , biocapteur, électrophysiologie (patch-clamp, double micro-électrodes), ingénierie moléculaire

Laboratoire d'accueil

Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale (UMR5075) 41, Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1